



Développement de méthodes de SRM à 4,7 T pour l'étude in vivo du métabolisme lipidique chez la souris.

Amandine Coum

► To cite this version:

Amandine Coum. Développement de méthodes de SRM à 4,7 T pour l'étude in vivo du métabolisme lipidique chez la souris.. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2015. Français. NNT : 2015REN1B025 . tel-01308526

HAL Id: tel-01308526

<https://theses.hal.science/tel-01308526>

Submitted on 28 Apr 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Génie Biologique et Médical

Ecole doctorale VAS

présentée par

Amandine Coum

Préparée à l'unité de recherche LTSI - INSERM UMR1099
Laboratoire du Traitement du Signal et de l'Image
Informatique – Electronique - ISTIC

Intitulé de la thèse
Ex. : Développement
de méthodes de SRM
à 4,7 T pour l'étude *in*
***vivo* du métabolisme**
lipidique chez la
souris.

Thèse soutenue à Rennes
le 9 décembre 2015

devant le jury composé de :

Jean-Marc CONSTANS

PU-PH, Université de Picardie Jules Verne /
rapporteur

Laurence LE MOYEC

PU, Université d'Evry Val d'Essonne / *rapporteuse*

Bernard FROMENTY

DR INSERM, Université de Rennes 1 / *examineur*

Sandra MEME

CR CNRS, Université d'Orléans / *examinatrice*

Giulio GAMBAROTA

PU, Université de Rennes 1 / *directeur de thèse*

Fanny NOURY

MCU, Université de Rennes 1 / *co-directrice de*
thèse

Sommaire

Liste des figures	5
Liste des tableaux	9
Liste des abréviations	11
Introduction générale	13
Chapitre 1 Spectroscopie par résonance magnétique (SRM)	19
1.1 Principe physique de la résonance magnétique nucléaire	21
1.1.1 Moment magnétique de spin	21
1.1.2 Champ magnétique statique \vec{B}_0	22
1.1.3 Excitation du système	26
1.1.4 Relaxation du système	28
1.1.5 Détection du signal de RMN, dépendance en T_1 et T_2	29
1.2 Spectroscopie localisée	31
1.2.1 Spectroscopie localisée monovoxel (SVS)	31
1.2.2 Suppression du signal de l'eau	34
Chapitre 2 Les lipides hépatiques : des marqueurs métaboliques	37
2.1 Anatomie générale du foie humain	39
2.2 Rôles métaboliques du foie	41
2.2.1 Métabolisme des glucides	41
2.2.2 Métabolisme des lipides	42
2.3 La stéatose hépatique non-alcoolique	43
2.3.1 Définition, prévalence et étiologie	43
2.3.2 Méthodes de détection non-invasives	44
2.4 Triglycérides et acides gras	51
2.4.1 Classification	52
2.4.2 Nomenclature utilisée en SRM	53

Chapitre 3	Effet de la suppression du signal de l'eau sur la quantification des lipides hépatiques	57
3.1	Animaux, patients et protocole expérimental	59
3.1.1	Animaux et patients	59
3.1.2	Protocole expérimental	60
3.2	Analyses préliminaires	64
3.2.1	Evaluation de la qualité spectrale	65
3.2.2	Validation du protocole d'acquisition	67
3.2.3	Evaluation de la qualité globale de l'ajustement du modèle sur les données brutes	73
3.3	Evaluation de l'effet de la suppression du signal de l'eau	76
3.3.1	La valeur de CRLB, paramètre de la qualité de la quantification	77
3.3.2	Evaluation de l'impact de la suppression du signal de l'eau au voisinage de la résonance de l'eau	81
3.3.3	Quantification de la composition des lipides hépatiques . . .	82
3.4	Discussion	83
3.5	Conclusion	87
Chapitre 4	Algorithmes de quantification des lipides	89
4.1	Etat de l'art	91
4.1.1	Algorithme de <i>Zancanaro et al.</i>	92
4.1.2	Algorithme de <i>Yeung et al.</i>	93
4.1.3	Algorithmes de <i>Strobel et al.</i> et de <i>Ren et al.</i>	95
4.1.4	Algorithme de <i>Corbin et al.</i>	96
4.1.5	Corrections en T_1 et/ou T_2	97
4.2	Validation des algorithmes sur objets-tests	98
4.2.1	Validation sur différentes huiles alimentaires	98
4.2.2	Validation sur des émulsions avec différentes fractions lipi- diques	109
4.3	Validation <i>in vivo</i> des algorithmes pour la quantification des lipides hépatiques	113
4.3.1	Etude pré-clinique sur modèles murins	113
4.3.2	Etude clinique	118
4.4	Validation <i>in vivo</i> des algorithmes pour la quantification des lipides mammaires	122
4.4.1	Patientes	123
4.4.2	Protocole d'acquisition	123

4.4.3	Résultats	124
4.4.4	Discussion	125
4.5	Conclusion	127
Chapitre 5 Développements pour la mesure du temps de relaxation longitudinale (T_1)		129
5.1	Mesure <i>in vivo</i> du temps de relaxation T_1	131
5.1.1	Problématique	131
5.1.2	Nouvelle méthode LOREEDE	134
5.2	Modification de la séquence PRESS de Bruker	135
5.2.1	Problème rencontré avec la séquence du constructeur	135
5.2.2	Solution proposée	137
5.3	Validation de la méthode LOREEDE	141
5.3.1	Validation sur objets-tests	141
5.3.2	Validation <i>in vivo</i> sur modèle animal : étude préliminaire	144
5.4	Conclusion	147
Conclusion		149
Bibliographie		155
Annexe A Article publié dans le journal "<i>Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medecine</i>"		167
Annexe B <i>Short communication</i> publiée dans le journal "<i>Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medecine</i>"		179

Liste des figures

1.1	<i>Levée de dégénérescence par l'application d'un champ magnétique statique \vec{B}_0.</i>	23
1.2	<i>Illustration de l'effet Zeeman.</i>	23
1.3	<i>Effet de l'application d'une impulsion RF, assimilée à un champ magnétique \vec{B}_1, sur l'aimantation macroscopique \vec{M}.</i>	26
1.4	<i>Transition de moments magnétiques nucléaires $\vec{\mu}_i$ de l'état up vers l'état down sous l'effet de l'impulsion RF.</i>	27
1.5	<i>Mise en place d'une cohérence de phase des moments magnétiques nucléaires $\vec{\mu}_i$ sous l'influence de l'impulsion RF.</i>	27
1.6	<i>Trajectoire suivie par le vecteur d'aimantation macroscopique lors du mouvement de précession libre.</i>	29
1.7	<i>Relation entre le FID produit à la suite directe de la première impulsion RF et l'écho de spin issu de la deuxième impulsion RF.</i>	30
1.8	<i>Arrivée au régime d'équilibre du signal après trois répétitions dans le cas d'une impulsion RF induisant un angle de basculement de 90°.</i>	30
1.9	<i>Excitation du volume d'intérêt pour la spectroscopie localisée monovoxel.</i>	31
1.10	<i>Chronogramme de la séquence PRESS.</i>	32
1.11	<i>Chronogramme de la séquence STEAM.</i>	33
1.12	<i>Schéma du module de suppression du signal de l'eau VAPOR dont les angles de basculement et les délais entre les impulsions RF sont optimisés.</i>	36
2.1	<i>Vues antérieure, viscérale et inférieure du foie avec la présentation générale des différentes structures anatomiques le composant.</i>	39
2.2	<i>Schématisation de l'organisation des lobules du tissu hépatique et de l'organisation histologique d'un lobule.</i>	40
2.3	<i>Coupe histologique d'une biopsie du foie d'un patient présentant une stéatose de grade 1.</i>	44
2.4	<i>Echographies d'un foie non-stéatotique et stéatotique.</i>	46

2.5	<i>Image tomodensitométrique acquise chez un patient sain et chez un patient atteint de stéatose.</i>	48
2.6	<i>Images obtenues par la méthode de Dixon chez un patient atteint de stéatose de grade 3.</i>	49
2.7	<i>Images acquises pour le calcul de la PDFF chez une patiente présentant une stéatose de grade 3.</i>	50
2.8	<i>Exemple de molécule de triglycéride formée de trois chaînes d'AG différentes.</i>	52
2.9	<i>Présentation de la nomenclature LCModel associée aux groupements chimiques d'une molécule d'AG, sur un spectre acquis à 4,7 T dans un tube d'huile de tournesol.</i>	54
3.1	<i>Spectre de SRM acquis sur le foie d'une souris présentant une forte fraction lipidique (FL = 36,5%).</i>	62
3.2	<i>Spectres de SRM acquis à 4,7 T dans le foie d'une souris et à 3,0 T dans le foie d'un patient, présentant des FL similaires.</i>	64
3.3	<i>Représentations graphiques des valeurs de CRLB en fonction du SNR mesurés pour les résonances Lip09 et Lip21 du sous-groupe HFL pré-clinique.</i>	68
3.4	<i>Représentations graphiques des valeurs de CRLB en fonction du SNR mesurés pour les résonances Lip09 et Lip21 des sous-groupes HFL et FFL pré-cliniques.</i>	69
3.5	<i>Représentations graphiques des valeurs de CRLB en fonction de la FWHM mesurées pour les résonances Lip09 et Lip21 des sous-groupes HFL et FFL pré-cliniques.</i>	71
3.6	<i>Représentations graphiques des valeurs de CRLB en fonction du rapport SNR/FWHM mesurés pour les résonances Lip09 et Lip21 des sous-groupes HFL et FFL pré-cliniques.</i>	72
3.7	<i>Spectres de SRM acquis sans (noWS) et avec (WS) suppression du signal de l'eau, dans le foie d'une souris présentant une haute FL, et dans le foie d'une souris présentant une faible FL.</i>	76
3.8	<i>Représentation graphique des valeurs du rapport R, calculé sans et avec suppression du signal de l'eau, du sous-groupe HFL pré-clinique.</i>	82
4.1	<i>Spectre de SRM acquis à 4,7 T sur un tube d'huile de tournesol.</i>	103
4.2	<i>Spectre de SRM acquis à 4,7 T sur un tube d'huile de colza.</i>	104
4.3	<i>Spectre de SRM acquis à 4,7 T sur un tube d'huile de noix.</i>	106

4.4	<i>Spectre de SRM acquis à 4,7 T sur un tube d'huile d'olive.</i>	107
4.5	<i>Spectres de SRM acquis à 4,7 T sur des tubes d'émulsions de FL égale à 5% et 20%.</i>	110
4.6	<i>Spectre de SRM acquis à 4,7 T dans le foie d'une souris obèse dont la fraction lipidique est de 34,8% présentant une FWHM de 53,8 Hz. . . .</i>	115
4.7	<i>Spectre de SRM acquis à 4,7 T dans le foie d'une souris contrôle. . . .</i>	116
4.8	<i>Spectre de SRM acquis à 3,0 T dans le foie d'un patient présentant une FL de 36,5%.</i>	120
4.9	<i>Spectre de SRM acquis à 3,0 T dans le sein d'une patiente.</i>	124
5.1	<i>Schématisation de l'effet de l'utilisation de la synchronisation respiratoire par rapport à sa non utilisation.</i>	133
5.2	<i>Principe de la mesure du T_1 par la méthode LOREDE.</i>	134
5.3	<i>Schéma d'une boucle de séquence PRESS avec l'utilisation du navigateur. . .</i>	136
5.4	<i>Comparaison entre le spectre issu de la somme des signaux obtenus par une séquence PRESS avec un "navigateur", et le spectre acquis par une séquence PRESS sans "navigateur".</i>	136
5.5	<i>Schéma d'une boucle de séquence PRESS avec "navigateur" modifiée (acPRESS).</i>	137
5.6	<i>Logigramme du fonctionnement du code Bruker pour la méthode acPRESS développée.</i>	138
5.7	<i>Visualisation des spectres individuels par le logiciel jMRUI à partir du fichier créé par Matlab, et somme de ces données par Matlab pour l'obtention du spectre final.</i>	140
5.8	<i>Comparaison entre un spectre acquis avec la séquence modifiée acPRESS et un spectre acquis avec une séquence PRESS classique.</i>	140
5.9	<i>Spectres acquis avec la séquence acPRESS dans un voxel d'intérêt placé dans le tube de gel.</i>	142
5.10	<i>Spectres acquis avec la séquence acPRESS dans un voxel d'intérêt placé dans le jaune de l'œuf.</i>	143
5.11	<i>Spectres acquis avec la séquence acPRESS dans un voxel d'intérêt placé dans le foie d'une souris.</i>	145

Liste des tableaux

3.1	Valeurs des bornes de Cramér-Rao (CRLB) de la résonance Lip21 (à 2,02 ppm), obtenues sans et avec suppression du signal de l'eau, du sous-groupe HFF pré-clinique.	78
3.2	Valeurs des bornes de Cramér-Rao (CRLB) de la résonance Lip13, obtenues sans et avec suppression du signal de l'eau, du sous-groupe FFL pré-clinique.	79
3.3	Résultats du test de Student entre les valeurs CRLB de chaque résonance lipidique, obtenues sans ou avec suppression du signal de l'eau, pour le groupe pré-clinique.	80
4.1	Composition détaillée en acides gras (AG) des huiles utilisées.	99
4.2	Valeurs moyennes des temps de relaxation longitudinale (T_1) et transversale (T_2), exprimées en ms, pour chaque résonance du spectre des lipides, mesurées sur les huiles de tournesol et colza à 4,7 T.	101
4.3	Résultats des calculs de quantification de la composition en AG de l'huile de tournesol.	103
4.4	Résultats des calculs de quantification de la composition en AG de l'huile de colza.	105
4.5	Résultats des calculs de quantification de la composition en AG de l'huile de noix.	106
4.6	Résultats des calculs de quantification de la composition en AG de l'huile d'olive.	108
4.7	Résultats des calculs de quantification de la composition en AG des émulsions de 5% à 40% de FL.	111
4.8	Résultats des calculs de quantification de la composition en AG dans le foie de la souris contrôle.	117
4.9	Résultats (en %) des calculs de quantification de la composition des lipides hépatiques d'un patient présentant une FL de 35,6%.	121

4.10	<i>Résultats des calculs de quantification de la composition des lipides dans le tissu mammaire sain de patientes à 3,0 T</i>	125
4.11	<i>Résultats des calculs de quantification de la composition en AG dans le tissu mammaire sain de patientes à 7,0 T.</i>	126
4.12	<i>Synthèse des résultats obtenus au cours des travaux de tests et validations des algorithmes de quantification en AG des lipides.</i>	128

Liste des abréviations

ω_0	Fréquence de Larmor
\vec{B}_0	Champ magnétique externe
\vec{B}_1	Champ magnétique radiofréquence
\vec{M}	Aimantation macroscopique.
T_1	Constante de temps de relaxation longitudinale.
T_2	Constante de temps de relaxation transversale.
AG	Acide Gras.
AGI	Acide Gras Insaturé.
AGMI	Acide Gras Mono-Insaturé.
AGPI	Acide Gras Poly-Insaturé.
AGS	Acide Gras Saturé.
ATP	Adénosine TriPhosphate.
CAP	<i>Controlled Attenuation Parameter.</i>
CHESS	<i>CHEmical Shift Selective.</i>
CRLB	<i>Cramér-Rao Lower Bound</i> ; Borne de Cramér-Rao.
FFL	Faible Fraction Lipidique.
FID	<i>Free Induction Decay</i> ; Signal de précession libre.
FL	Fraction Lipidique.
FLI	<i>Fatty Liver Index.</i>
FWHM	<i>Full Width at Half Maximum</i> ; Largeur à mi-hauteur.
HASTE	<i>Half-Fourier Acquisition Single-shot Turbo Spin Echo.</i>

HFL Haute Fraction Lipidique.

IDEAL *Iterative Decomposition of water and fat with Echo Asymmetry and Least-squares estimation*

IMC Indice de Masse Corporelle.

IRM Imagerie par Résonance Magnétique.

L-COSY *Localized COrrrelated SpectroscopY*.

LOREEDE *LOngitudinal Relaxation time Evaluation from Dynamic Equilibrium* ; nouvelle méthode de mesure *in vivo* du T_1 proposée dans ce manuscrit.

MRI-PDFF *Magnetic Resonance Imaging - Proton Density Fat Fraction*.

NAFLD *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease* ; Maladie du foie gras non-alcoolique.

NASH *Non-Alcoholic StatoHepatitis* ; Stéatohépatite non alcoolique.

PDFF *Proton Density Fat Fraction*.

ppm Partie par million.

PRESS *Point RESolved Spectroscopy*.

RARE *Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement*.

RF Radiofréquence.

RMN Résonance Magnétique Nucléaire

Sel-MQC *Selective Multiple-Quantum Coherence transfer*.

SNR *Signal to Noise Ratio* ; Rapport signal sur bruit.

SRM Spectroscopie par Résonance Magnétique.

STEAM *STimulated Echo Acquisition Mode*.

SVS *Single Voxel Spectroscopy* ; Spectroscopie mono-voxel.

TSE *Turbo Spin Echo*

VAPOR *Variable Pulse Power and Optimized Relaxation Delay*.

VCTE *Vibration Controlled Transient Elastography* : Elastographie impulsionnelle à vibration contrôlée.

WET *Water suppression Enhanced through T_1 effects*.

Introduction générale

L'obésité est devenue, au cours des dernières années, un problème majeur dans le monde entier, avec l'observation d'une augmentation de la morbidité et de la mortalité associées à des pathologies liées à l'obésité, telles que le diabète de type 2, l'hypertension et certaines hépatopathies (stéatose et stéatohépatites, regroupées sous le nom de *nonalcoholic fatty liver disease* (NAFLD) en anglais) [1]. En raison de ce problème de santé mondial, les recherches cliniques et pré-cliniques se sont de plus en plus intéressées au métabolisme lipidique, avec un intérêt particulier pour la quantification des lipides hépatiques [2–4] utilisée pour le diagnostic de la stéatose.

Durant de nombreuses années, le *gold standard* pour le diagnostic de la stéatose a été l'observation de coupes histologiques issues d'une biopsie du tissu hépatique. A partir de cette biopsie, une quantification de la composition des lipides hépatiques est réalisable par des analyses biochimiques, principalement la chromatographie en phase gazeuse, coûteuses en temps. Le prélèvement d'une biopsie étant une intervention invasive et à risque, surtout dans le cas de patients souffrant d'obésité et de troubles de la cicatrisation, d'autres modalités de diagnostic de la stéatose ont été développées. Des scores à partir de marqueurs sérologiques et de facteurs environnementaux [5–7] sont utilisés pour diagnostiquer une stéatose sans en évaluer le grade. Les méthodes d'imagerie échographique, tomодensitométrie, ou par résonance magnétique (IRM), ont l'avantage de permettre l'évaluation de l'état d'une plus large zone du tissu hépatique en comparaison avec une biopsie. Cependant, l'examen échographique ne diagnostique pas la présence d'une stéatose en dessous d'une fraction lipidique de 20% par un examen classique, ou 11% par l'utilisation du CAP (*Controlled Attenuation Parameter* [8] en anglais). L'imagerie tomодensitométrie permet l'observation du foie entier, mais présente l'inconvénient principal d'être ionisante. De plus, le grade de la stéatose diagnostiquée n'est pas mesurable, et une faible stéatose passera inaperçue (diagnostic d'une stéatose à partir de la fin du grade 1 : fraction lipidique $\geq 30\%$). Enfin, l'IRM permet la mesure de manière non-invasive et non-ionisante, de la fraction lipidique (FL) du tissu hépatique, d'où un diagnostic de la stéatose avec le grade de gravité de cette dernière, et ce, dès une infiltration lipidique faible ($\geq 5,56\%$). La spectroscopie par résonance magnétique (SRM) apporte une information complémentaire par rapport à l'IRM par l'observation des résonances des différents groupements chimiques des acides gras (AG) composant les lipides. La quantification de la composition lipidique est alors envisageable [9] à partir des résonances de chacun des composants des lipides, qui sont : les protons des méthylènes $(\text{CH}_2)_n$, les protons

des méthyles $(\text{CH})_3$, les protons oléfiniques, les protons des méthylènes en position α du groupe carboxyle, les protons des méthylènes en position β du groupe carboxyle, les protons des méthylènes en position α des protons oléfiniques et les protons diacyles [10].

La SRM, non-invasive et non-ionisante, apparaît donc comme une méthode de choix pour le diagnostic de la stéatose par la mesure de la FL hépatique [5, 10–12]. D'autre part, le grade de stéatose pouvant être affecté par un régime alimentaire, ou aggravé par la prise de certains médicaments [13, 14], la SRM permet le suivi longitudinal d'un patient sans risque de complications [15]. De plus, la connaissance de la composition lipidique est de grande importance pour l'étude du métabolisme lipidique, d'où l'utilisation de la SRM dans de nombreuses études pré-cliniques et cliniques, de la littérature.

Cependant, aucun protocole n'est identifié comme référence pour l'acquisition des spectres de SRM, dont l'objectif est la quantification de la composition des lipides hépatiques. Deux approches principales sont utilisées : l'une pour laquelle, avant l'excitation, des impulsions de suppression du signal de l'eau sont appliquées, et l'autre pour laquelle aucune suppression du signal de l'eau n'est appliquée. A ce jour, aucune expérimentation n'a étudié de manière systématique et quantitative l'effet de cette suppression du signal de l'eau sur la quantification des lipides hépatiques.

De même que pour le protocole d'acquisition, il n'existe pas de référence reconnue pour la quantification de la composition des lipides. La littérature scientifique propose différents algorithmes de quantification de la composition des lipides à partir des données extraites des spectres de SRM acquis [16–20], utilisés dans le cadre d'études aux applications variées telles que l'observation des lipides du tissu adipeux, de la moelle épinière ou du tissu hépatique.

Motivés par le constat de manque de méthodes de référence pour l'acquisition et le traitement des données de SRM pour la quantification de la composition des lipides hépatiques, les travaux de cette thèse ont eu pour objectif l'étude des protocoles d'acquisition et de traitement des données de SRM pour en proposer les plus appropriés aux applications visant le tissu hépatique *in vivo*.

Ce manuscrit s'articule en cinq chapitres. Les deux premiers chapitres présentent le principe physique de la SRM localisée monovoxel d'une part, et le contexte clinique du diagnostic de la stéatose et de la recherche de biomarqueurs

de cette pathologie d'autre part. Le troisième chapitre présente les travaux issus du questionnement concernant la nécessité de l'utilisation d'un module de suppression du signal de l'eau, dans le cadre d'une étude pré-clinique et clinique, pour l'acquisition de données de SRM visant la quantification de la composition en acides gras des lipides hépatiques. Suite à ces résultats, un état de l'art détaillé des différents algorithmes de quantification de la composition en acides gras des lipides, publiés dans la littérature, est réalisé dans le quatrième chapitre. Les tests de validations de ces algorithmes, sur des objets-tests et *in vivo*, y sont présentés, dans le but de déterminer l'algorithme le plus adapté à la problématique de la quantification de la composition en acides gras des lipides hépatiques *in vivo*. Enfin, motivée par la recherche de nouveaux biomarqueurs de la stéatose et les résultats des travaux de *Hu et al.* [21], je présente dans le cinquième chapitre une nouvelle méthode de mesure du temps de relaxation longitudinale (T_1) de l'eau et de la résonance majeure des lipides hépatiques, par SRM *in vivo*.

Chapitre 1

Spectroscopie par résonance magnétique (SRM)

Sommaire

1.1	Principe physique de la résonance magnétique nucléaire	21
1.1.1	Moment magnétique de spin	21
1.1.2	Champ magnétique statique \vec{B}_0	22
1.1.3	Excitation du système	26
1.1.4	Relaxation du système	28
1.1.5	Détection du signal de RMN, dépendance en T_1 et T_2 .	29
1.2	Spectroscopie localisée	31
1.2.1	Spectroscopie localisée monovoxel (SVS)	31
1.2.2	Suppression du signal de l'eau	34

Ce chapitre vise à présenter le phénomène de résonance magnétique nucléaire (RMN) permettant l'obtention d'un spectre à partir de l'utilisation de séquences d'acquisitions particulières dans un volume d'intérêt. Après une description des principes physiques de base de la RMN, allant de la définition du moment magnétique nucléaire jusqu'au phénomène de relaxation après une excitation, le principe de la spectroscopie par résonance magnétique localisée sera détaillé. Les deux séquences d'acquisition principalement utilisées dans ces travaux de thèse seront présentées.

1.1 Principe physique de la résonance magnétique nucléaire

La spectroscopie par résonance magnétique (SRM) est basée sur le phénomène de résonance magnétique nucléaire. Comme son nom l'indique, le principe physique de la RMN repose sur les propriétés magnétiques du noyau atomique, à savoir son moment magnétique nucléaire, lié au moment angulaire intrinsèque \vec{J} , communément appelé "spin". De fait, seuls les noyaux ayant un nombre de spin non nul sont utilisables pour l'obtention d'un spectre de SRM. De manière générale, le proton de l'hydrogène ^1H est le plus utilisé pour les applications *in vivo* de la RMN, en raison de sa forte présence dans les tissus biologiques, rendant le signal reçu plus élevé et permettant un temps d'acquisition plus court. Cependant, d'autres éléments tels que le fluor ^{19}F , le sodium ^{23}Na , le carbone ^{13}C et le phosphore ^{31}P sont utilisés lors d'études spécifiques. Dans la suite de cette partie, le moment magnétique nucléaire sera défini en détail et le principe d'obtention d'un signal RMN exposé.

1.1.1 Moment magnétique de spin

Le moment magnétique nucléaire d'un noyau $\vec{\mu}$ est proportionnellement lié au spin \vec{J} de ce dernier selon la relation suivante :

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{J} \quad (1.1)$$

où γ est le rapport gyromagnétique, propre à chaque noyau.

Pour l'application de la RMN, seuls les noyaux possédant un moment magnétique nucléaire sont utilisables. Pour cela, il faut que le nombre de spin du noyau,

noté I , soit non nul. C'est en s'intéressant à la norme du vecteur $\vec{\mu}$, et donc à celle du vecteur \vec{J} , que l'importance du nombre de spin I est remarquable :

$$\|\vec{\mu}\| = \gamma\hbar\sqrt{I(I+1)} \quad (1.2)$$

où $\hbar = h/2\pi$ avec h la constante de Planck.

L'attribution du nombre de spin à un atome suit trois règles simples suivant la composition du noyau (nombre de masse A , numéro atomique Z et nombre de neutrons N) :

1. A et Z pairs, le noyau se verra attribuer un nombre de spin $I = 0$;
2. A impair, le nombre de spin aura une valeur demi-entière, $I = \frac{1}{2} ; \frac{3}{2} ; \frac{5}{2} ; \dots$;
3. A pair et Z impair, le noyau sera doté d'un nombre de spin à valeur entière, $I = 1 ; 2 ; 3 ; \dots$

Ainsi les éléments ^1H , ^{19}F , ^{13}C , ^{31}P ont un nombre de spin $I = 1/2$, et ^{23}Na a un nombre de spin $I = 3/2$. Pour la suite de cette partie, le proton ^1H sera pris en exemple du fait de son intérêt lors des travaux présentés dans cette thèse.

1.1.2 Champ magnétique statique \vec{B}_0

Lorsque l'on applique un champ magnétique statique \vec{B}_0 à une population de protons, deux effets sont observés :

- une levée de dégénérescence (figure 1.1),
- une précession du moment magnétique nucléaire autour de l'axe de \vec{B}_0 .

Levée de dégénérescence

Dans un volume de matière comprenant des protons, en l'absence d'un champ magnétique statique, les moments magnétiques nucléaires $\vec{\mu}_i$ s'orientent de manière complètement aléatoire (figure 1.1.A), donnant une aimantation macroscopique résultante \vec{M} nulle. En revanche, confrontés à un champ magnétique statique \vec{B}_0 , les moments magnétiques nucléaires $\vec{\mu}_i$ vont s'aligner suivant la direction de ce dernier. Si l'analogie entre les moments magnétiques nucléaires $\vec{\mu}_i$ et des aiguilles de boussoles est souvent faite, elle n'est plus entièrement valable lorsque les moments magnétiques nucléaires $\vec{\mu}_i$ sont plongés dans un champ magnétique statique. En effet, les aiguilles de boussoles vont s'aligner dans la même direction et le même

sens que le champ magnétique statique \vec{B}_0 alors que les moments magnétiques nucléaires $\vec{\mu}_i$ ont le choix entre $(2I + 1)$ orientations par rapport à la direction de \vec{B}_0 . Pour les protons, il y a alors levée de la dégénérescence. Les moments magnétiques nucléaires $\vec{\mu}_i$ ont deux possibilités d'orientation : de façon parallèle (aussi appelée *up*, ou $\text{spin} + 1/2$) ou anti-parallèle (aussi appelée *down*, ou $\text{spin} - 1/2$) à \vec{B}_0 (figure 1.1.B).

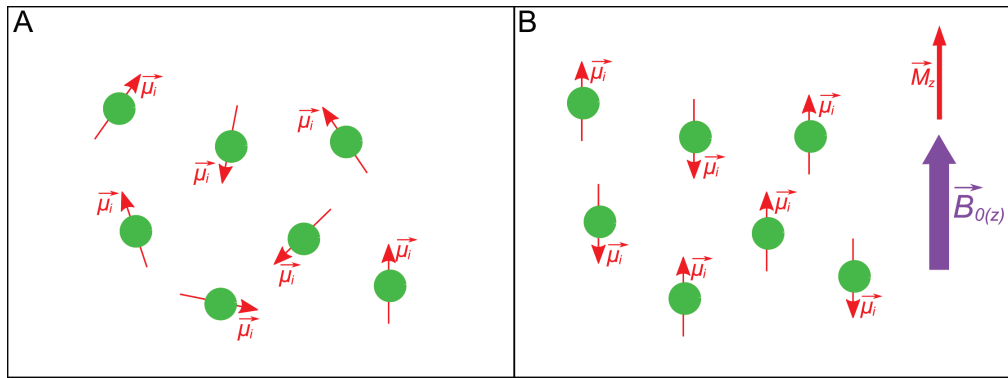


FIGURE 1.1 – Levée de dégénérescence par l'application d'un champ magnétique statique \vec{B}_0 .

Les deux orientations de moments magnétiques nucléaires $\vec{\mu}_i$ définies précédemment lors de la mise en présence de l'échantillon au champ \vec{B}_0 correspondent à la séparation de deux niveaux d'énergie E_{up} et E_{down} connue sous le nom de l'effet Zeeman (figure 1.2) :

$$E_{up} = -\frac{1}{2}\gamma\hbar\|\vec{B}_0\| \quad ; \quad E_{down} = \frac{1}{2}\gamma\hbar\|\vec{B}_0\| \quad (1.3)$$

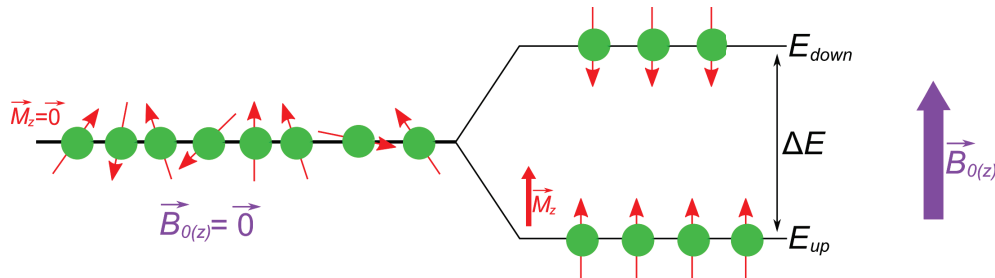


FIGURE 1.2 – Répartition des populations de moments magnétiques nucléaires $\vec{\mu}_i$ sur les niveaux d'énergie E_{up} et E_{down} sous l'effet du champ magnétique statique \vec{B}_0 : Effet Zeeman. La surpopulation de l'état E_{up} (relation de Boltzmann) est à l'origine de l'aimantation macroscopique \vec{M} selon l'axe de \vec{B}_0 (z).

Le niveau d'énergie de l'état *up* étant plus bas, il s'en retrouve légèrement plus peuplé que l'état *down*. La distribution de population entre les deux orientations est donnée par la relation de Boltzmann :

$$\frac{N_{up}}{N_{down}} = \exp\left(\frac{\Delta E}{kT}\right) \quad (1.4)$$

avec N_{up} et N_{down} la quantité de moments magnétiques nucléaires $\vec{\mu}_i$ orientés parallèlement et anti-parallèlement, respectivement, k la constante de Boltzmann et T la température en Kelvin. La différence d'énergie ΔE étant négligeable par rapport à kT , par approximation, il est possible d'en déduire la différence de population entre les deux niveaux d'énergie :

$$N_{up} - N_{down} \approx N \frac{\gamma \hbar \|\vec{B}_0\|}{2kT} \quad (1.5)$$

où N est la population totale de moments magnétiques nucléaires $\vec{\mu}_i$ ($N = N_{up} + N_{down}$). La surpopulation du niveau *up* par rapport au niveau *down* est confirmée. D'où une aimantation macroscopique résultante suivant l'axe de \vec{B}_0 , choisi comme étant l'axe \vec{z} du référentiel du laboratoire, non-nulle :

$$\|\vec{M}\| = M_z = \frac{\gamma \hbar^2 \|\vec{B}_0\| N}{4kT} \quad (1.6)$$

Précession angulaire

Le deuxième effet de l'application du champ magnétique statique \vec{B}_0 au système de protons est la mise en rotation de ces derniers autour de l'axe de \vec{B}_0 , appelée précession angulaire de spin, à la pulsation de Larmor ω_0 définie comme suit :

$$\omega_0 = \gamma \|\vec{B}_0\| \quad (1.7)$$

La fréquence Larmor, définie par l'équation 1.8, est la fréquence de résonance des noyaux à laquelle l'excitation doit avoir lieu si l'on souhaite obtenir un signal RMN issu de ces noyaux. On remarque que la fréquence de Larmor est dépendante de deux paramètres : le rapport gyromagnétique γ et la force du champ magnétique statique \vec{B}_0 . Par exemple, à 1 T, le noyau d'hydrogène (^1H) résonne à 42,58 MHz et le noyau de phosphore-31 (^{31}P) à 11,26 MHz.

C'est parce que la fréquence de Larmor est dépendante du rapport gyroma-

gnétique γ , propre à chaque noyau, qu'il est possible d'obtenir un signal de RMN à partir d'un seul type de noyau, tel que le proton. En effet, par le choix d'une fréquence d'excitation appropriée ν_0 , la fréquence de Larmor, définie par l'équation 1.8, il est possible d'exciter exclusivement les protons par exemple.

$$\nu_0 = \frac{\omega_0}{2\pi} = \frac{\gamma \|\vec{B}_0\|}{2\pi} \quad (1.8)$$

Le phénomène d'excitation à partir d'une impulsion radiofréquence sera expliqué dans la suite de ce chapitre.

Déplacement chimique

La dépendance de la fréquence de Larmor avec la valeur du champ magnétique statique \vec{B}_0 est un élément clé de la RMN, car elle induit le principe de déplacement chimique. Au sein d'un même système de moments magnétiques nucléaires $\vec{\mu}_i$, ici des protons, différentes fréquences de résonance sont observables pour deux raisons.

La première est l'existence d'inhomogénéités du champ magnétique \vec{B}_0 . De fait, à partir de l'équation 1.8, il est évident que les protons partageant la même valeur de γ vont cependant avoir différentes valeurs de fréquence de Larmor en fonction des valeurs observées de \vec{B}_0 .

La deuxième raison est l'effet de déplacement chimique. Les protons présents dans l'échantillon observé subissent ce que l'on appelle un blindage par le nuage électronique voisin en raison de leur position relative dans une molécule, ou de leur proximité par rapport à d'autres éléments. Ce blindage a pour effet une faible modification de la valeur du champ magnétique statique perçue localement, \vec{B}_{local} , par ces protons suivant la relation suivante :

$$\|\vec{B}_{local}\| = \|\vec{B}_0\|(1 - \sigma) \quad (1.9)$$

avec σ la constante d'écran dépendante de l'environnement électronique de chaque proton. En introduisant le champ magnétique perçu, \vec{B}_{local} , par un groupement de protons dans l'équation générale 1.8 définissant l'expression de la fréquence de Larmor, l'existence de différentes fréquences pour un même système protonique

est mise en évidence :

$$\nu_{locale} = \frac{\gamma \|\vec{B}_{local}\|}{2\pi} = \nu_0(1 - \sigma) \quad (1.10)$$

Cette différence de fréquence de résonance est utilisée pour la construction du spectre de RMN par la définition du déplacement chimique δ exprimé en ppm (partie par million) :

$$\delta = \frac{\nu_{locale} - \nu_{ref}}{\nu_0} 10^6 \quad (1.11)$$

défini par rapport à une référence choisie arbitrairement (ν_{ref}).

Pour simplifier la suite de cette description du principe général de formation d'un signal de RMN, le cas idéal dans lequel l'échantillon observé ne présente qu'un seul groupe de moments magnétiques nucléaires $\vec{\mu}_i$ dont la fréquence de Larmor est ν_0 est pris en compte.

1.1.3 Excitation du système

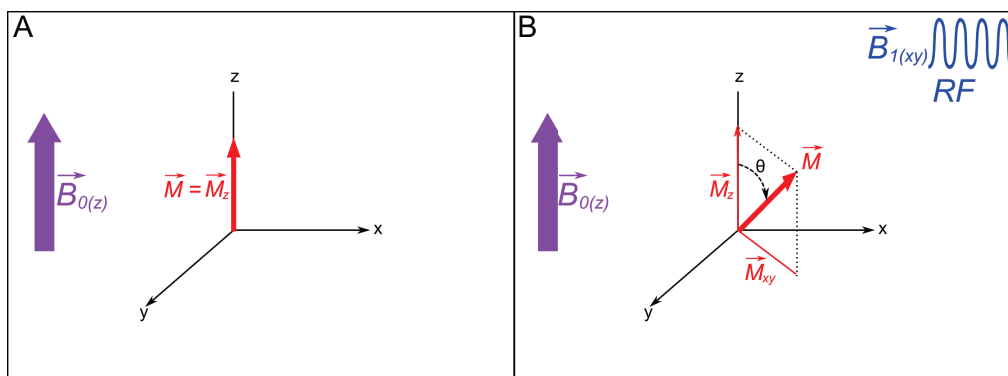


FIGURE 1.3 – Effet de l'application d'une impulsion RF, assimilée à un champ magnétique \vec{B}_1 , sur l'aimantation macroscopique \vec{M} . (A) $\vec{M} = \vec{M}_z$ avant application de l'impulsions RF. (B) Basculement de l'aimantation macroscopique \vec{M} d'un angle θ sous l'effet de l'impulsion RF \vec{B}_1 , et apparition de la composante transverse \vec{M}_{xy} .

L'excitation des protons est réalisée par l'application d'une impulsion radio-fréquence (RF) assimilée à un champ magnétique externe \vec{B}_1 , à la fréquence de Larmor ν_0 , dans le plan transverse au champ magnétique statique \vec{B}_0 . L'aimantation macroscopique \vec{M} , présentant une composante longitudinale \vec{M}_z unique avant l'excitation (figure 1.3.A), s'en retrouve alors basculée suivant l'angle de basculement θ appliqué (fonction de l'énergie déposée par l'impulsion RF), d'où l'apparition d'une composante transversale \vec{M}_{xy} de l'aimantation (figure 1.3.B). Le

basculement est expliqué par l'action de deux phénomènes liés à l'application de l'impulsion RF, l'un dont l'action est ciblée sur \vec{M}_z , et l'autre agissant sur \vec{M}_{xy} .

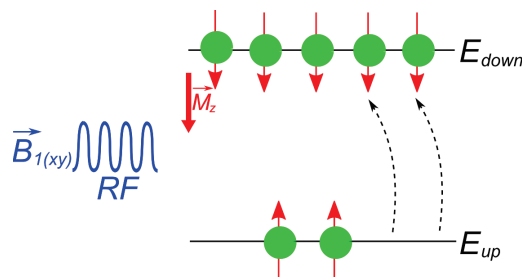


FIGURE 1.4 – Transition de moments magnétiques nucléaires $\vec{\mu}_i$ de l'état *up* vers l'état *down* sous l'effet de l'impulsion RF.

Avant l'excitation, l'état d'équilibre correspond à une surpopulation de l'état de spin *up* par rapport à l'état *down*, d'où l'apparition de la composante \vec{M}_z . L'énergie apportée par l'impulsion RF va avoir pour effet la transition de certains moments magnétiques nucléaires $\vec{\mu}_i$ de l'état *up* vers l'état *down* (figure 1.4), impliquant une diminution de la résultante longitudinale \vec{M}_z de l'aimantation macroscopique. Plus l'énergie déposée par l'impulsion RF est augmentée, plus \vec{M}_z sera diminuée jusqu'à être inversée.

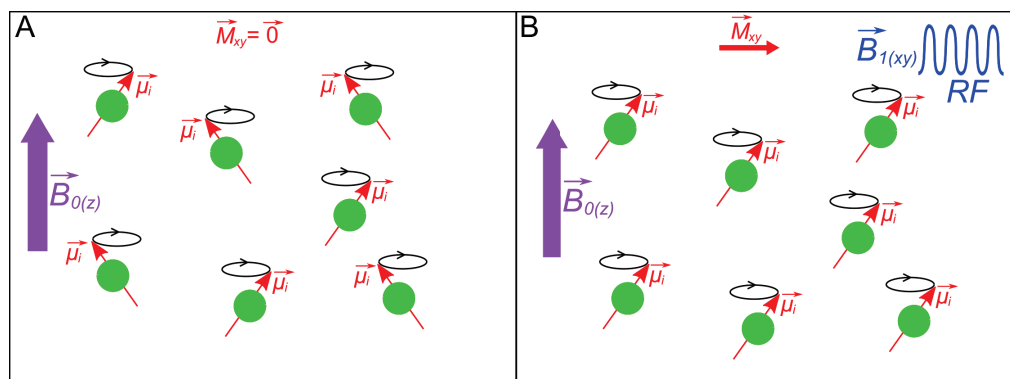


FIGURE 1.5 – Mise en place d'une cohérence de phase des moments magnétiques nucléaires $\vec{\mu}_i$ sous l'influence de l'impulsion RF. L'exemple est donné ici pour les moments magnétiques nucléaires dans l'état *up*. (A) Sous l'effet unique de \vec{B}_0 les moments magnétiques nucléaires $\vec{\mu}_i$ précessent autour de l'axe \vec{z} sans cohérence de phase. (B) L'impulsion RF provoque la mise en cohérence de phase des moments magnétiques nucléaires $\vec{\mu}_i$, faisant apparaître une composante transverse \vec{M}_{xy} de l'aimantation macroscopique.

D'autre part, les moments magnétiques nucléaires $\vec{\mu}_i$ plongés dans le champ statique \vec{B}_0 précessent autour de son axe (\vec{z}) sans cohérence de phase (figure 1.5.A).

La résultante transversale \vec{M}_{xy} de l'aimantation macroscopique est alors nulle. L'application au système d'une impulsion RF va alors créer une cohérence de phase des moments magnétiques nucléaires $\vec{\mu}_i$ de l'échantillon (figure 1.5.B). Celle-ci sera maintenue pendant toute la durée de l'application d'une impulsion RF.

1.1.4 Relaxation du système

Lors de l'arrêt de l'application de l'impulsion RF, le système de moments magnétiques nucléaires $\vec{\mu}_i$, et donc la résultante d'aimantation macroscopique \vec{M} , tend à récupérer son état d'équilibre. Par des transitions de l'état de haute énergie *down* vers l'état de basse énergie *up*, des protons ayant été excités précédemment, la composante longitudinale \vec{M}_z recroît de manière exponentielle. Cette recroissance est caractérisée par un temps de relaxation longitudinale T_1 défini comme étant le temps nécessaire pour que \vec{M}_z retrouve 63% de sa valeur d'équilibre après une bascule de 90° . Simultanément, l'arrêt de l'impulsion RF entraîne un retour à l'état de dégénérescence de phase entre les moments magnétiques nucléaires $\vec{\mu}_i$, induisant une décroissance de la composante \vec{M}_{xy} , elle aussi exponentielle, jusqu'à sa disparition. Cette décroissance est caractérisée par un temps de relaxation transversale T_2 défini comme le temps nécessaire pour qu'il ne reste plus que 37% de \vec{M}_{xy} produite par l'excitation ayant provoqué une bascule à 90° . Si l'on considère les effets d'inhomogénéités de champ magnétique, une décroissance plus rapide de la composante \vec{M}_{xy} est observée, alors caractérisée par le temps de relaxation T_2^* ($T_2^* < T_2$).

Le mouvement suivi par l'aimantation macroscopique lors de son retour à l'équilibre, appelé le mouvement de précession libre (figure 1.6), est décrit par les équations de Bloch :

$$\begin{cases} \frac{dM_x(t)}{dt} = \gamma[\vec{M}(t) \times \vec{B}(t)]_x - \frac{M_x(t)}{T_2} \\ \frac{dM_y(t)}{dt} = \gamma[\vec{M}(t) \times \vec{B}(t)]_y - \frac{M_y(t)}{T_2} \\ \frac{dM_z(t)}{dt} = \gamma[\vec{M}(t) \times \vec{B}(t)]_z - \frac{M_z(t) - M_0}{T_1} \end{cases} \quad (1.12)$$

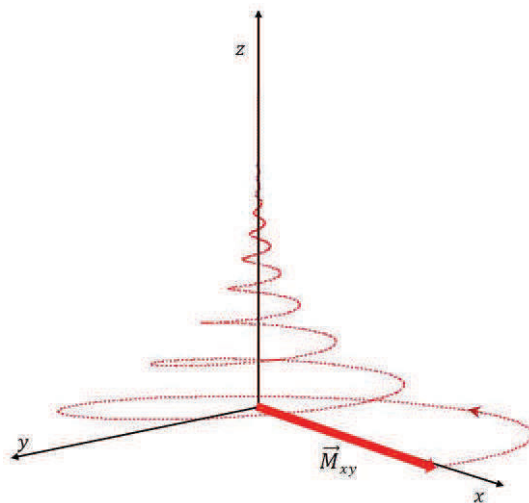


FIGURE 1.6 – Trajectoire suivie par le vecteur d'aimantation macroscopique lors du mouvement de précession libre.

1.1.5 Détection du signal de RMN, dépendance en T_1 et T_2

Le signal de RMN est généré par la composante transversale \vec{M}_{xy} de l'aimantation lors du retour de l'aimantation \vec{M} à l'état d'équilibre. La détection de ce signal est réalisée par une bobine, dans le plan transverse au champ magnétique statique \vec{B}_0 , et repose sur le principe physique énoncé par la loi de Faraday. Ainsi, lors du mouvement de précession libre de \vec{M} , le flux magnétique représenté par le vecteur d'aimantation transverse \vec{M}_{xy} va induire un courant variable dans la bobine. Ce signal, appelé signal de précession libre (ou FID pour *Free Induction Decay* en anglais), oscille à la fréquence ν_0 et décroît exponentiellement selon la constante de temps T_2^* . Cette décroissance, due au déphasage des moments magnétiques nucléaires, est très rapide et entraîne une disparition rapide du signal mesurable. Il est alors nécessaire d'appliquer de nouveau une impulsion RF suivant la troisième direction du plan après un temps τ afin de forcer un rephasage des moments magnétiques nucléaires. Ceci a pour effet la création d'un écho (aussi appelé écho de spin), avec la composante \vec{M}_{xy} à son maximum, après un temps $TE = 2\tau$ (appelé temps d'écho) suivant l'impulsion d'excitation initiale. C'est ce signal, répliquant le FID créé juste après la première impulsion RF, qui sera acquis pour l'obtention d'un spectre par SRM ou d'une image par IRM par l'application d'une transformée de Fourier (figure 1.7). Afin d'obtenir une valeur maximale du signal, il est important que la valeur de TE soit la plus courte possible par rapport au T_2 de l'échantillon. Dans le cas contraire, on parlera d'un signal pondéré en T_2 .

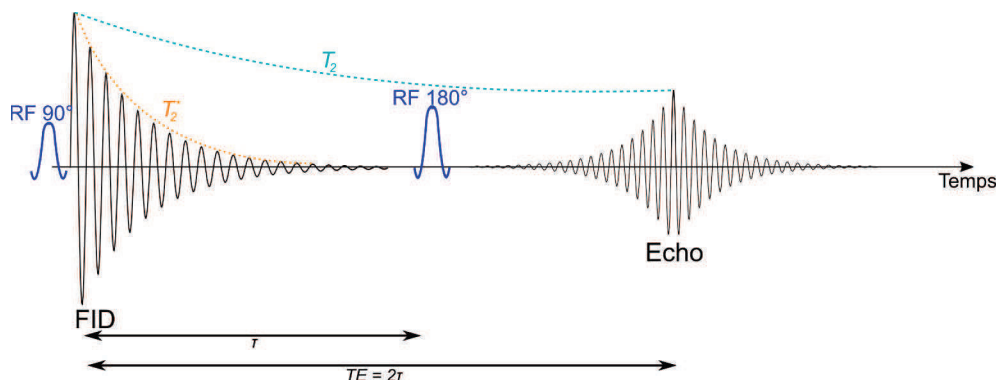


FIGURE 1.7 – Relation entre le FID produit à la suite directe de la première impulsion RF et l'écho de spin issu de la deuxième impulsion RF.

De manière générale, lors d'une acquisition de RMN, il est nécessaire de répéter plusieurs fois la même séquence d'impulsion afin d'effectuer la somme des signaux ainsi obtenus dans le but d'augmenter la quantité de signal. La répétition se fait après un temps TR (temps de répétition) suivant la première impulsion radiofréquence, ou excitation. Dans le cas d'une bascule de 90° , après la première excitation, la composante transverse est égale à l'amplitude maximale de l'aimantation macroscopique. Pendant le temps TR , du fait de la précession libre, la composante longitudinale \vec{M}_z va croître. Si le TR est court, l'aimantation n'aura pas le temps d'arriver à son amplitude maximale, d'où une amplitude du signal plus faible après la deuxième excitation. Le signal sera alors pondéré en T_1 . Après plusieurs répétitions, un régime d'équilibre est atteint, l'aimantation longitudinale basculée à chaque excitation a le temps de récupérer son état d'équilibre avant l'excitation suivante (figure 1.8).

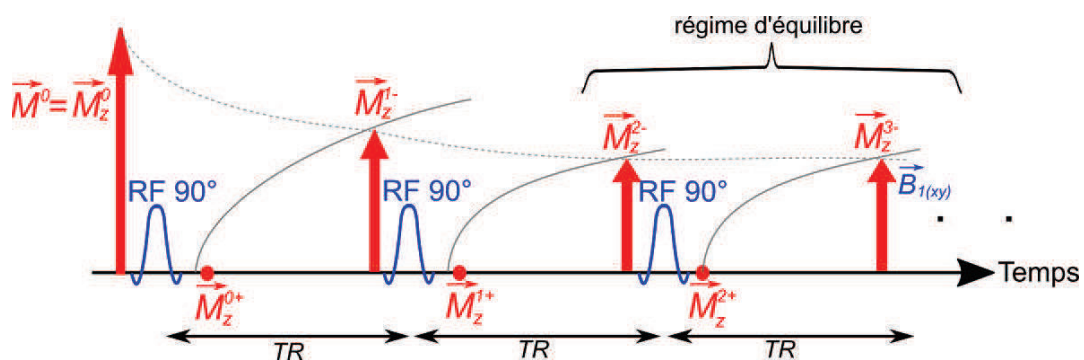


FIGURE 1.8 – Arrivée au régime d'équilibre du signal après trois répétitions dans le cas d'une impulsion RF induisant un angle de basculement de 90° .

1.2 Spectroscopie localisée

Ce travail de thèse s'intéresse exclusivement aux méthode de spectroscopie par résonance magnétique (SRM), la formation d'une image par IRM ne sera pas expliquée ici. Une modalité de la SRM est l'acquisition du signal dans un volume d'intérêt localisé au sein d'un échantillon plus grand, ou d'un organisme biologique complet, notamment *in vivo*. Une localisation de l'excitation est alors nécessaire, afin de ne détecter que le signal issu du volume d'intérêt (voxel). Cette méthodologie est appelée la spectroscopie simple voxel, ou monovoxel, souvent désignée par l'acronyme SVS (pour *Single Voxel Spectroscopy* en anglais).

1.2.1 Spectroscopie localisée monovoxel (SVS)

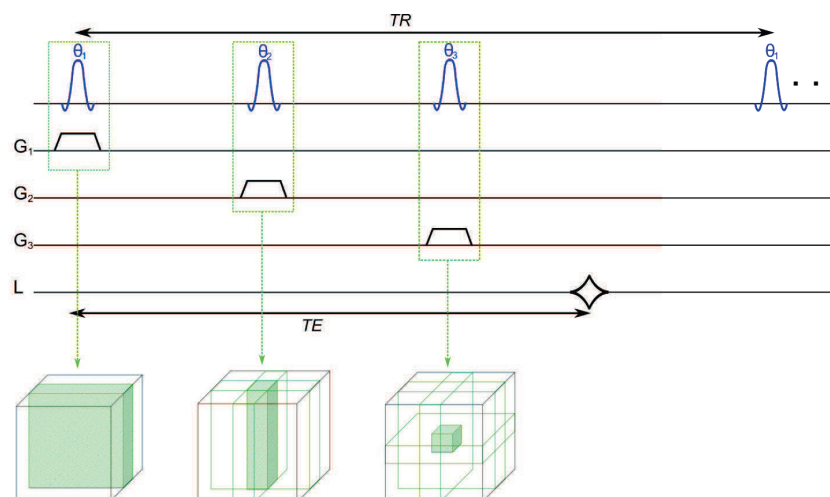


FIGURE 1.9 – Excitation du volume d'intérêt par trois impulsions RF successives (θ_1 , θ_2 et θ_3) couplées à des gradients de sélection de coupe (G_1 , G_2 et G_3) selon les trois axes de l'espace. L'écho de spin issu du signal du voxel excité est lu (ligne L) après un temps TE suivant la première impulsion RF. Le motif est répété après un temps TR suivant cette même impulsion.

Les deux séquences les plus utilisées pour les acquisitions de SRM monovoxel sont les séquence PRESS (pour *Point RESolved Spectroscopy* [22] en anglais) et STEAM (pour *STimulated Echo Acquisition Mode* [23] en anglais). Pour ces deux séquences d'acquisition, la localisation du voxel à exciter est réalisée par trois impulsions RF successives couplées à des gradients de sélection de coupe, dans les trois directions de l'espace (figure 1.9). La première impulsion excite les moments magnétiques nucléaires présents dans une coupe suivant un axe du plan en fonction du gradient lui étant associé. La seconde impulsion RF est accompagnée d'un

gradient suivant un axe perpendiculaire au premier, et aura pour effet d'exciter une coupe suivant cet axe. A ce stade, seul le parallélépipède situé à l'intersection de ces deux coupes a subi les excitations des deux impulsions RF. Enfin, la troisième impulsion, couplée à un gradient suivant l'axe perpendiculaire au plan formé par les deux axes précédents, excite une coupe suivant cet axe, d'où l'excitation sélective d'un volume cubique, l'intersection des trois coupes.

Séquence PRESS

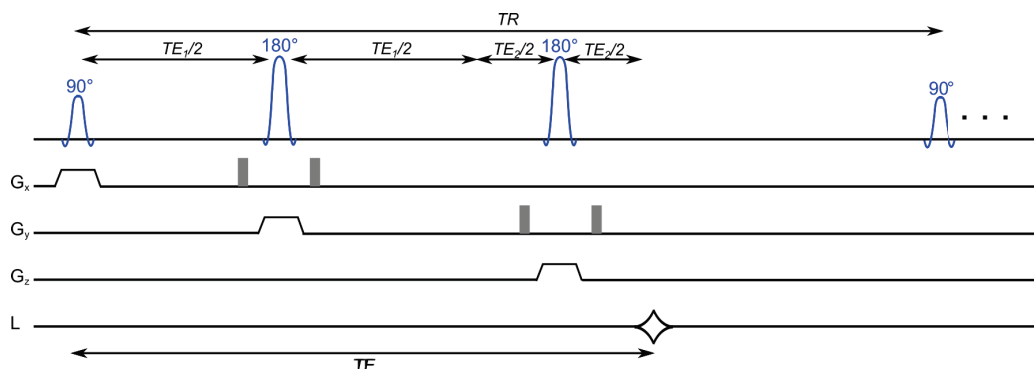


FIGURE 1.10 – Chronogramme de la séquence PRESS. Les gradients de déphasage utilisés pour éliminer toute composante transverse résiduelle sont représentés en gris.

La séquence PRESS, dont le chronogramme est présenté par la figure 1.10, est une séquence utilisant le principe d'un double écho de spin combinant l'utilisation d'une impulsion RF d'excitation, et deux impulsions RF de rephasage. Les trois impulsions RF appliquées suivent le schéma suivant : $90^\circ - TE_1/2 - 180^\circ - (TE_1 + TE_2)/2 - 180^\circ - TE_2/2 - Acquisition$. Après un temps $TE_1/2$ suivant la première impulsion RF de 180° , un premier écho de spin est créé, correspondant au signal issu de l'intersection parallélépipédique entre les deux premières coupes sélectionnées. La deuxième impulsion RF de 180° est donc appliquée dans le but d'obtenir un deuxième écho de spin, après un temps $TE_2/2$ suivant cette impulsion (donc un temps TE après la première excitation à 90°), issu du signal acquis dans le cube intersectant les trois plans de coupe sélectionnés.

L'amplitude du signal ainsi obtenu (S) est définie par l'équation suivante :

$$S = S_0 \left[1 - 2 \exp \left(-\frac{(TR - \frac{TE}{2})}{T_1} \right) + \exp \left(-\frac{TR}{T_1} \right) \right] \exp \left(-\frac{TE}{T_2} \right) \quad (1.13)$$

avec S_0 l'amplitude maximale du signal dû à l'aimantation maximale après la première impulsion RF à 90° . En pratique, les temps d'écho et de répétition utilisés

sont tels que $TR \gg TE$, d'où l'équation 1.13 peut être simplifiée :

$$S = S_0 \left[1 - \exp\left(-\frac{TR}{T_1}\right) \right] \exp\left(-\frac{TE}{T_2}\right) \quad (1.14)$$

Le principal inconvénient de cette méthode est l'inexactitude des profils de coupe liée aux imperfections de calibration des impulsions RF à 180° . Cependant, l'acquisition d'un signal d'écho d'amplitude maximale est réalisée.

Séquence STEAM

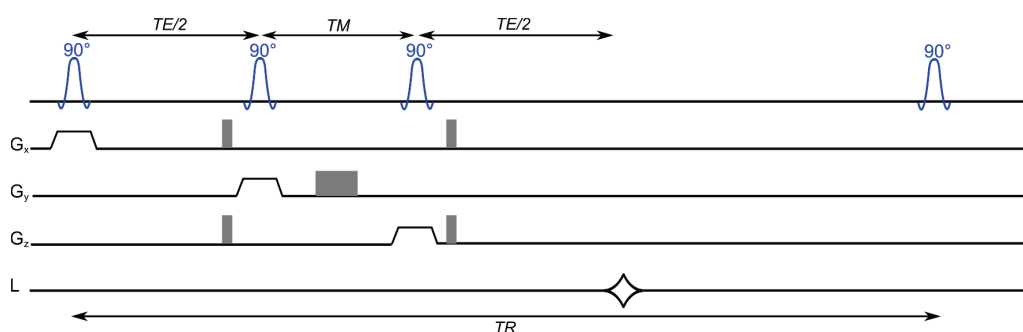


FIGURE 1.11 – Chronogramme de la séquence STEAM. Les gradients de déphasage utilisés pour éliminer toute composante transverse résiduelle sont représentés en gris.

Le chronogramme de la séquence STEAM est présenté dans la figure 1.11. A la différence de la séquence PRESS qui utilise deux valeurs d'angle de basculement induit par les deux types d'impulsions RF, la séquence STEAM effectue la localisation du voxel par trois impulsions RF à 90° selon le schéma : $90^\circ - TE/2 - 90^\circ - TM - 90^\circ - TE/2 - Acquisition$, avec TM le temps de mélange. Cette séquence va produire trois signaux, chacun successif à l'une des impulsions RF, quatre échos de spin (SE) et un écho de spin stimulé (STE). Parmi les SE, trois sont formés par les différents couples d'impulsions (SE_{12} après un temps TE , SE_{23} après un temps $TE/2 + 2TM$, et SE_{13} après un temps $TE + 2TM$ après la première impulsion RF à 90°) et un issu du phénomène de double spin écho (SE_{123} après un temps $TE + TM$ suivant la première impulsion RF à 90°). Le signal acquis lors de l'application de la séquence STEAM est l'écho de spin stimulé dont l'amplitude maximale apparaît au bout d'un temps $TE + TM$ suivant la première impulsion RF d'excitation à 90° . Les SE et FID présentés précédemment sont éliminés par les gradients de déphasages placés de part et d'autre du couple formé par les deuxième et troisième impulsions RF.

Le signal généré (S) est défini par l'équation suivante :

$$S = \frac{S_0}{2} \sin(\theta_1) \sin(\theta_2) \sin(\theta_3) \exp\left(-\frac{TM}{T_1}\right) \exp\left(-\frac{TE}{T_2}\right) \quad (1.15)$$

où θ_1 , θ_2 et θ_3 sont les valeurs des angles de basculement induit par les trois impulsions RF dans le cas général. Pour la séquence STEAM utilisant trois angles à 90° , l'équation 1.15 est simplifiée comme suit :

$$S = \frac{S_0}{2} \exp\left(-\frac{TM}{T_1}\right) \exp\left(-\frac{TE}{T_2}\right) \quad (1.16)$$

Il est alors remarquable que seule la moitié de l'amplitude d'un signal d'écho de spin est observée par ce type d'acquisition. Ceci est dû au fait que seule la moitié de la composante d'aimantation transverse est basculée par la deuxième impulsion RF à 90° , la deuxième moitié étant déphasée par le gradient de déphasage appliqué lors du TM . Contrairement à la séquence PRESS, le fait de ne pas utiliser d'impulsions RF à 180° permet une sélection plus précise du volume à exciter. D'autre part, cette séquence permet des acquisitions avec un TE beaucoup plus court que dans le cas de la séquence PRESS, permettant l'étude de métabolites dont le T_2 est faible.

1.2.2 Suppression du signal de l'eau

Lors d'une acquisition de SRM, il est commun de supprimer le signal provenant des protons des molécules d'eau dans le but d'observer les signaux de métabolites présents en plus faible concentration (pour des applications sur le cerveau par exemple). Les modules de suppression du signal de l'eau utilisés lors des travaux présentés dans ce manuscrit sont construits à partir d'un motif de base, présenté par Haase *et al.* [24]. Cette séquence d'impulsion, appelée CHESS (pour *CHEmical Shift Selective* en anglais) est constituée d'une impulsion RF sélective en fréquence à 90° suivie d'un gradient de déphasage. L'impulsion CHESS est appliquée avant l'impulsion RF d'excitation de la séquence d'acquisition choisie, et a pour effet la bascule d'une partie de l'aimantation longitudinale due aux moments magnétiques nucléaires des protons des molécules d'eau dans le plan transverse. Cette composante transverse est ensuite déphasée, et le signal de l'eau est donc "éliminé" laissant les contributions des autres systèmes de moments magnétiques nucléaires à l'aimantation intactes. Le temps séparant ce module de la première impulsion d'excitation de la séquence d'acquisition se doit donc d'être le plus court possible afin de minimiser la recroissance de l'aimantation longitudinale des protons de

l'eau.

En pratique, un motif CHESS n'est jamais appliqué seul. Les modules de suppression du signal de l'eau sont construits par la reproduction de ce motif de deux à sept fois. La répétition de l'élément CHESS aura pour effet de limiter la sensibilité aux inhomogénéités des champs magnétiques \vec{B}_0 et \vec{B}_1 . Cependant, la suppression du signal de l'eau par ce type de méthode est dégradée par la recroissance en T_1 de l'aimantation liée au signal de l'eau en raison des délais entre les différents motifs CHESS. Dans le but d'améliorer la suppression du signal de l'eau, des modules ont été développés en optimisant le nombre de motifs CHESS utilisés, l'angle de basculement appliqué par chacun de ces motifs, ainsi que le délai temporel entre chaque élément CHESS. Parmi ces méthodes, deux ont été utilisées dans les travaux présentés dans ce manuscrit : WET (pour *Water suppression Enhanced through T_1 effects* [25] en anglais) et VAPOR (pour *Variable Pulse Power and Optimized Relaxation Delay* [26] en anglais). Le module WET utilise quatre motifs CHESS dont les angles de basculement ont été optimisés pour limiter la sensibilité de la suppression du signal de l'eau par rapport au T_1 et aux inhomogénéités du champ magnétique \vec{B}_1 . Le module VAPOR utilise sept motifs CHESS dont les délais séparant ces motifs ont été optimisés en plus des angles de basculement. L'ajout de la modification des délais entre les impulsions CHESS permet d'obtenir une aimantation due au signal de l'eau quasi nulle même dans le cas d'une mauvaise calibration des angles de basculement (figure 1.12). Cette méthode, plus performante, n'est cependant pas disponible nativement sur tous les spectromètres imageurs cliniques.

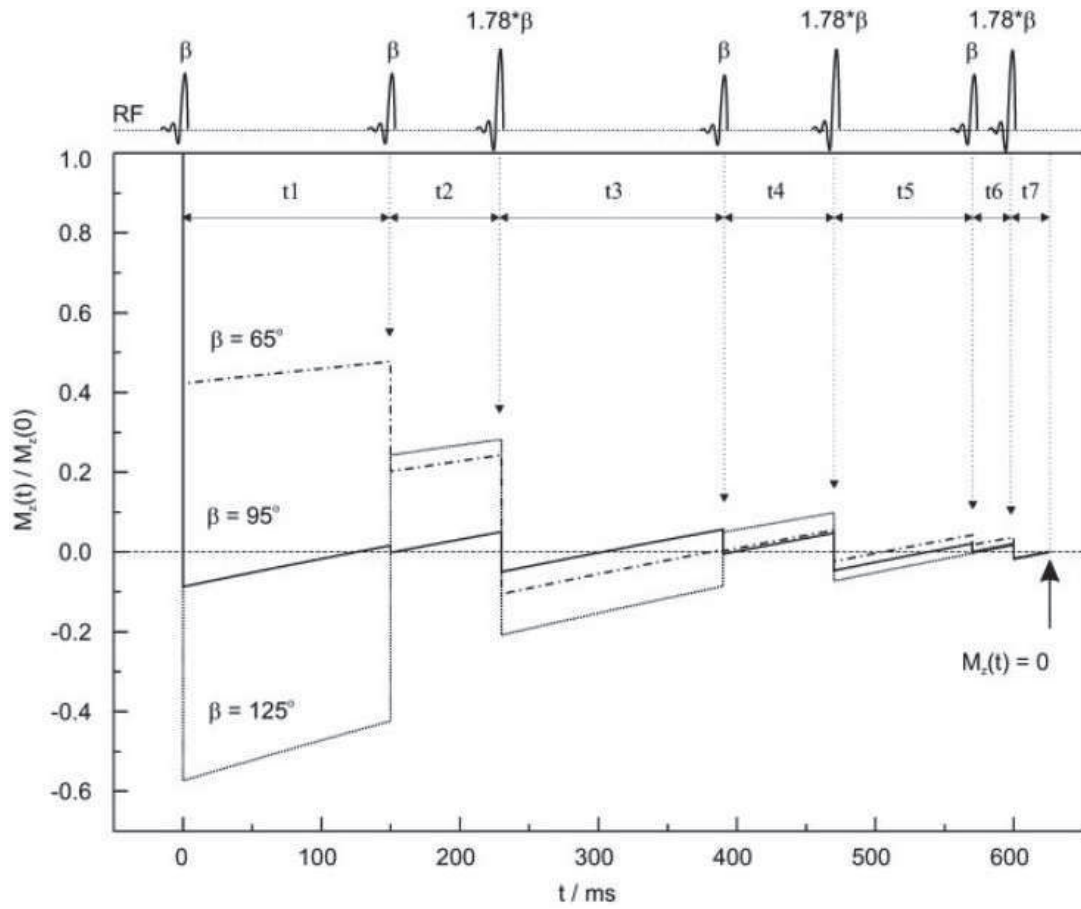


FIGURE 1.12 – Schéma du module de suppression du signal de l'eau VAPOR dont les angles de basculement et les délais entre les impulsions RF sont optimisés. La dépendance de l'aimantation résiduelle de l'eau en fonction du temps est présentée pour trois valeurs d'angle de basculement initial. Source : Tkáč et al. [26]

Chapitre 2

Les lipides hépatiques : des marqueurs métaboliques

Sommaire

2.1	Anatomie générale du foie humain	39
2.2	Rôles métaboliques du foie	41
2.2.1	Métabolisme des glucides	41
2.2.2	Métabolisme des lipides	42
2.3	La stéatose hépatique non-alcoolique	43
2.3.1	Définition, prévalence et étiologie	43
2.3.2	Méthodes de détection non-invasives	44
2.4	Triglycérides et acides gras	51
2.4.1	Classification	52
2.4.2	Nomenclature utilisée en SRM	53

2.1 Anatomie générale du foie humain

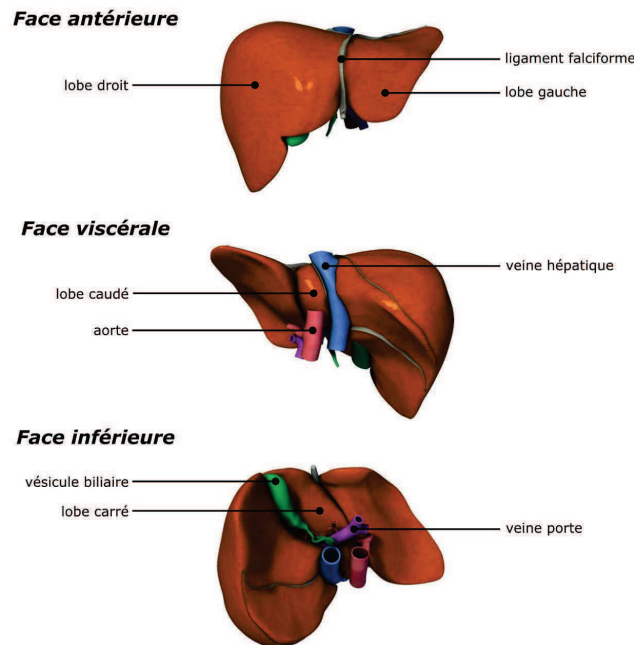


FIGURE 2.1 – Vues antérieure, viscérale et inférieure du foie avec la présentation générale des différentes structures anatomiques le composant (lobes, vascularisation, vésicule biliaire). Les images ont été obtenues à partir du site internet "Virtual Liver" : <http://pie.med.toronto.ca/vliver> [27].

Le foie est un organe du système digestif assurant trois fonctions vitales pour l'organisme : épuration, synthèse et stockage énergétiques. C'est l'organe le plus volumineux du corps humain. Il représente de 2,3 à 3% du poids d'un adulte (1,5 kg en moyenne), a une largeur comprise entre 25 et 30 cm, une longueur de 12 à 20 cm et une épaisseur de 6 à 10 cm [28]. Il se situe dans la partie supérieure droite de l'abdomen presque entièrement protégé par la cage thoracique, et est séparé du cœur et des poumons par le diaphragme. En raison de cette proximité directe avec le diaphragme, la position du foie est dépendante de la fréquence respiratoire pouvant provoquer un déplacement allant jusqu'à 3 cm. Le foie est composé de quatre lobes :

- sur la face antérieure : les lobes droit et gauches, séparés par le ligament falciforme ;
- sur la face viscérale : le lobe carré ;
- sur la face inférieure : le lobe caudé.

Le hile du foie (séparant le lobe carré du lobe caudé) est le lieu de pénétration

de la veine porte et de l'artère hépatique ; il est également traversé par les canaux biliaires (figure 2.1). Ces quatre lobes sont eux-mêmes divisés en huit segments, sorte de pièces d'assemblage du foie, représentant des contours anatomiques importants pour les interventions chirurgicales.

La vascularisation du foie est très dense. Environ 10% du sang d'un adulte est contenu dans le foie qui est traversé par 1,4 L de sang chaque minute, en moyenne. L'artère hépatique, issue de division de l'aorte, amène un quart de volume sanguin vers le foie, mais représente les trois quarts de l'apport d'oxygène. Le restant des besoins arrive au foie par la veine porte, source d'un sang riche en nutriments. Ces deux vaisseaux se divisent ensuite en des réseaux denses de vaisseaux très fins afin d'irriguer la totalité des cellules hépatiques.

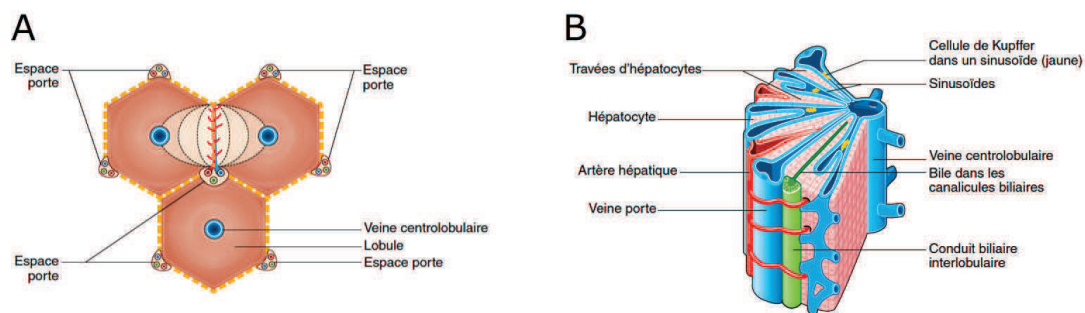


FIGURE 2.2 – Schématisation de l'organisation des lobules du tissu hépatique (A) et de l'organisation histologique d'un lobule (B). Source : Dominique Wendum (A) et François Durand (B), à partir de l'ouvrage "Les fondamentaux de la pathologie digestive" [29].

Le tissu hépatique est structuré en millions de lobules, structures hexagonales centrées sur une veine centrolobulaire et présentant à leur périphérie des espaces portes réunissant un capillaire de la veine porte, un canal biliaire et un capillaire artériel (figure 2.2 A). Chaque lobule est constitué de travées d'hépatocytes, séparées les unes des autres par le sinusoiide dans lequel se trouvent les cellules de Kupffer (figure 2.2 B). Le sinusoiide est l'espace dans lequel se font les échanges entre le sang, provenant des espaces portes, et les hépatocytes, avant de guider ce sang vers la veine centrolobulaire. Le sang arrivant dans la veine centrolobulaire sera ensuite déversé dans les veines hépatiques, puis dans la veine cave. Les hépatocytes sont le siège des fonctions métaboliques du foie, dont la production de la bile collectée par les canaux biliaires présents dans les espaces portes. Les cellules de Kupffer sont des macrophages participant à l'absorption des nutriments, mais aussi à l'épuration du sang des débris cellulaires, microbes, ou autres agents biologiques ayant

traversé la barrière intestinale et pénétré dans le foie, par phagocytose.

2.2 Rôles métaboliques du foie

Comme expliqué précédemment, le foie assure trois fonctions. L'une est liée à son rôle d'épuration par le traitement des déchets organiques présents dans le sang, notamment par la conversion de l'ammoniac, produit par le colon, en urée, et par la biotransformation des xénobiotiques. En ce qui concerne les fonctions de synthèse et de stockage effectuées par le foie, elles sont mises en œuvre pour la livraison et le stockage des nutriments (sucres, protéines, lipides), ainsi que lors de la production et de l'excrétion des sels biliaires et de la bile. Dans la suite de ce chapitre, l'intérêt sera porté aux fonctions liées aux sucres et aux lipides, et les métabolismes énergétique et lipidique seront présentés.

2.2.1 Métabolisme des glucides

On appelle métabolisme des glucides, ou métabolisme énergétique, la fonction de stockage et de livraison des sucres par le foie, et notamment le glucose, à partir duquel les molécules d'ATP (Adénosine TriPhosphate), briques d'énergie, sont produites. Le principal rôle du foie est donc de conserver une concentration en glucose dans le sang dans des limites physiologiques.

En période post-prandiale, une augmentation de la concentration en glucose du sang sinusoïdal est observée. Deux voies métaboliques sont possibles pour réguler cette concentration. La première est la glycogénogénèse, transformation du glucose en glycogène, un polymère glucidique qui sera stocké dans les hépatocytes. Cette voie étant stimulée par l'insuline, dont la sécrétion augmente lors de la période post-prandiale, c'est elle qui sera favorisée. La seconde est la glycolyse anaérobie permettant la synthèse d'ATP à partir de l'oxydation du glucose en pyruvate, de manière simplifiée. Cette voie est régulée par la quantité d'ATP déjà présente dans les cellules, et donc du besoin énergétique à ce moment. Le pyruvate produit lors de cette réaction sera utilisé pour la synthèse de l'acétyl-CoA nécessaire à la réaction de synthèse de lipides (triglycérides).

En revanche, lors d'une période de jeûn, la concentration en glucose du sang sinusoïdal est diminuée. Le foie va alors inhiber la glycolyse hépatique et augmenter sa production de glucose. La première voie utilisée est la glycogénolyse qui est la dégradation du glycogène stocké dans les hépatocytes pour produire des molécules de

glucoses. La seconde est la néoglucogenèse, synthèse de glucose à partir de composés non glucidiques. Trois substrats non glucidiques sont disponibles dans le foie : le lactate, certains acides aminés (surtout l’alanine) et le glycérol (issu de la lipolyse) utilisés dans 60%, 30% et 10% des cas de néoglucogenèse, respectivement [28].

Il est important de noter que, le stockage du glycogène dans les hépatocytes est limité. Dans le cas d’un régime trop riche en glucose, ou d’hyperinsulinisme, le métabolisme lipidique du foie sera mis en jeu.

2.2.2 Métabolisme des lipides

De manière générale, les rôles du foie dans le métabolisme lipidique sont les suivants :

- l’oxydation des acides gras circulants pour la production d’énergie ;
- la synthèse des lipoprotéines pour le transport des lipides vers le tissu adipeux dans le but d’un stockage ;
- la synthèse du cholestérol si l’apport alimentaire n’est pas suffisant ;
- la dégradation du cholestérol par la voie biliaire en cas d’excès ; il est important de noter que le foie est le seul organe apte à cette dégradation ;
- la transformation du glucose et des protéines en graisses en vue d’un stockage ;
- la captation des acides gras circulants dans le plasma et leur transformation en triglycérides stockés sous forme de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes.

Comme exposé précédemment, une partie du métabolisme lipidique hépatique est intimement liée au métabolisme des glucides. En effet, lors d’un fort apport en glucose par l’alimentation, ou dans le cas d’une sur-expression d’insuline, les réserves de glycogène du foie (et des muscles) peuvent arriver à saturation. L’excédent de glucose passe alors par la voie lipidique pour le stockage. Par la lipogenèse *de novo*, le glucose est transformé en acides gras circulants qui s’ajoutent à ceux provenant de l’apport alimentaire et des réserves des tissus adipeux. Ces acides gras suivront ensuite trois destinations : l’oxydation dans la mitochondrie, un assemblage et un export vers les autres organes sous forme de lipoprotéine ou la production de triglycérides et le stockage sous forme de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes [30]. Cette voie de stockage est normalement mineure chez un individu sain et dont le régime alimentaire est équilibré.

2.3 La stéatose hépatique non-alcoolique

2.3.1 Définition, prévalence et étiologie

La stéatose est définie comme une accumulation anormale de lipides dans les hépatocytes. Biochimiquement, une accumulation lipidique dépassant les 5% du poids du foie atteste d'un état de stéatose [31]. En pratique, le diagnostic se fait histologiquement lorsque plus de 5% des hépatocytes présentent des macrovésicules ou "gouttelettes" de lipides [32]. Lors d'études par SRM, la stéatose est définie par une fraction lipidique (pourcentage de lipides dans le volume étudié par rapport à l'eau) dépassant 5,56% [4].

La stéatose ainsi définie est divisée en quatre grades de sévérité en fonction de la proportion d'hépatocytes renfermant une gouttelette lipidique :

- grade 0 : moins de 5% des hépatocytes sont touchés, le foie est considéré normal ;
- grade 1 : de 5% à 33% des hépatocytes sont concernés, la stéatose est faible ;
- grade 2 : de 34% à 66% des hépatocytes sont concernés, la stéatose est dite modérée ;
- grade 3 : plus de 66% des hépatocytes présentent une goutte de lipides, la stéatose est alors sévère.

D'autre part, il existe deux types de stéatoses suivant la distribution des vacuoles lipidiques dans les hépatocytes. Le premier type est une forme micro-vésiculaire de la stéatose où un hépatocyte est occupé par plusieurs petites gouttelettes lipidiques sans déplacement de son noyau. Cette forme est la plus grave et peut être vue dans le cas de la toxicité de plusieurs médicaments, d'un défaut d'oxydation des acides gras, d'alcoolisme ou de pathologies telles que le syndrome de Reye [33–35]. Le type le plus courant est la stéatose macro-vacuolaire, où un hépatocyte touché contient une seule grande goutte de lipides, qui déforme sa paroi et déplace le noyau de la cellule vers sa périphérie. Ce type de stéatose est le plus commun et est observé chez des patients alcooliques, ou souffrant de NAFLD (pour *Non Alcoholic Fatty Liver Disease* en anglais) [36], dont il est le premier stade susceptible d'évoluer vers une stéatohépatite (NASH pour *Non-Alcoholic SteatoHepatitis* en anglais) étant une stéatose associée à des lésions nécrotiques, ou une cirrhose non-alcoolique. Du fait de leur caractère non-alcoolique, le diagnostic de ces pathologies ne peut être fait que dans le cas d'une consommation journalière inférieure à trois verres d'alcool pour un homme et deux verres d'alcool pour une femme [30]. En plus de la prise en compte des habitudes de consommations, il doit y avoir absence de prédisposition

génétique ou d'autres maladies telles que le syndrome métabolique.

Au cours des dernières années, la NAFLD a représenté 75% des maladies chroniques du foie aux Etats-Unis [37]. On estime que 20 à 30% de la population générale du monde occidental est concernée [38], et approximativement un milliard d'individus dans le monde [30] sont touchés. Un facteur connu de prédisposition à la stéatose est l'obésité, surtout dans le cas de la présence d'un diabète de type 2. En effet, la stéatose touche 90% des personnes en obésité morbide [38] et 70% des patients de diabète de type 2 [39]. Enfin, en raison de l'augmentation croissante de l'obésité dans le monde, la NAFLD est devenue plus commune que les maladies dues à l'alcool [40].

2.3.2 Méthodes de détection non-invasives

Aujourd'hui encore, le *gold-standard* pour le diagnostic de la stéatose est l'analyse histologique d'une biopsie (figure 2.3). En plus d'être invasive, souvent douloureuse et source de complications, rendant cette méthode non reproductible et inadaptée au suivi longitudinal d'un patient, la quantification de la stéatose est très dépendante de l'opérateur, à savoir le pathologiste. De plus, le résultat est obtenu à partir d'une infime partie du tissu hépatique et n'est donc pas représentatif de l'ensemble du foie. De nombreuses recherches portent donc sur le développement d'outils de diagnostic de la stéatose par l'utilisation de méthodologies non invasives.

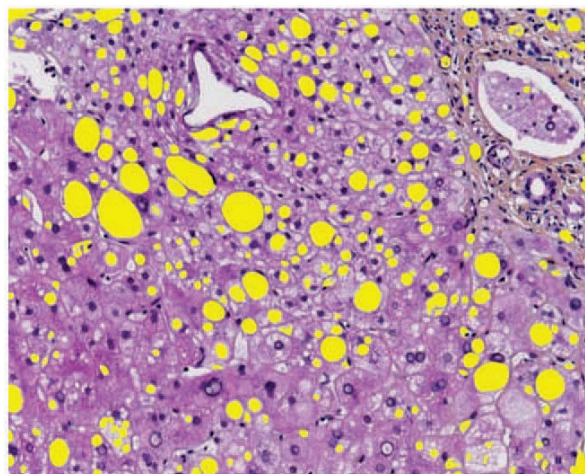


FIGURE 2.3 – Coupe histologique d'une biopsie du foie d'un patient présentant une stéatose de grade 1. Les vacuoles lipidiques ont été segmentées semi-automatiquement (jaune). Source : d'Assignie et al. [41]

Marqueurs sérologiques

Plusieurs méthodes de diagnostic de la stéatose à partir de marqueurs sérologiques ont été développées sous forme de "scores" calculés par une combinaison de paramètres issus des prélèvements sanguins (cholestérol, triglycérides, glucose, etc...) ou environnementaux (tour de taille, genre, indice de masse corporelle (IMC)). L'un des plus complexes est le SteatoTest® [42] utilisant douze composants dont des marqueurs de fibrose et de nécrose hépatocytaire (FibroTest® et Acti-Test® respectivement [43]) n'étant pas toujours disponibles dans les centres hospitaliers. Ce score présente une sensibilité allant jusqu'à 90% et une spécificité de 88% pour le diagnostic d'une stéatose faible ($> 5\%$), et a été validé par comparaison avec une méthode échographique. Deux autres scores, le FLI (pour *Fatty Liver Index*) [6] et le *NAFLD liver fat score* [7] prennent en compte des données issues des prélèvements sanguins (triglycérides, gamma-glutamyl-transpeptidase, insuline, alanine aminotransferase et aspartate aminotransferase), des paramètres cliniques du patient tels que la présence du syndrome métabolique, d'un diabète de type 2, ou encore le tour de taille du patient et son IMC. Ces deux scores permettent le diagnostic d'une stéatose de grade 1 avec 84% et 86% de précision, respectivement. A la différence du SteatoTest®, ces deux scores sont facilement applicables en routine clinique et peu coûteux par rapport à des méthodologies telles que l'échographie ou l'IRM.

Cependant, ces scores n'ayant pas été validés par la même technologie (échographie, SRM, biopsie), il paraît difficile de les comparer entre eux pour en déterminer le plus approprié au diagnostic de la stéatose. De plus, ces scores sont pour le moment utilisés dans le but de mieux sélectionner les patients à risques afin de les orienter vers un examen clinique tel que l'échographie, ou de leur donner des conseils d'hygiène de vie.

Enfin, ces marqueurs sérologiques permettent le diagnostic de la stéatose, mais n'informent pas sur le grade d'avancement de cette stéatose, ne permettant donc pas l'observation de l'évolution de l'état d'un patient au cours d'un traitement ou d'un régime.

Examens échographiques

L'examen échographique utilise la capacité des tissus à réfléchir les ondes ultrasonores. La stéatose, observée lors de ce type d'examen, se traduit par une augmentation de l'échogénicité du tissu hépatique en raison de la présence des lipides intracellulaires. Du fait de sa disponibilité dans tous les environnements

hospitaliers et de son faible coût, l'échographie est très largement utilisée pour le premier diagnostic de la stéatose. En plus de la simple observation de l'aspect du foie, des indicateurs semi-quantitatifs pour la quantification de la stéatose ont été développés [44,45], utilisant l'évaluation du contraste entre le foie et le rein (figure 2.4), la visibilité des vaisseaux sanguins hépatiques, et de la limite avec la vésicule biliaire. Cependant, la sensibilité et la spécificité de l'examen échographique varient beaucoup suivant la méthode utilisée (60-94% et 66-95%, respectivement [46]). De plus, ces méthodes ne permettent pas la détection d'une stéatose en dessous de 20% de lipides hépatiques, et sont très opérateur-dépendantes. En effet, une étude a montré une corrélation intra-opérateurs allant de 55% à 68% s'agissant de déterminer le degré de sévérité de l'infiltration lipidique hépatique [47].

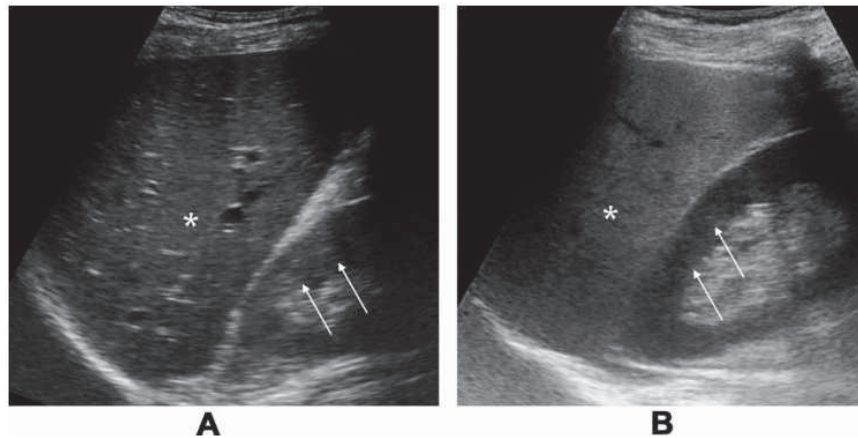


FIGURE 2.4 – Echographies d'un foie non-stéatotique (A) et stéatotique (B). Chez le patient souffrant de stéatose (B), l'échogénicité du foie (étoile blanche) est augmentée par rapport à celle du rein (flèches blanches), alors que dans le cas du foie sain (A), les échogénicités de ces deux structures sont similaires. Source : Schwenzer et al [48]

Des études récentes proposent l'utilisation de la sonde Fibroscan®(Echosens, France), utilisant l'élastographie impulsionnelle à vibration contrôlée (VCTE pour *Vibration Controlled Transient Elastography* en anglais), pour la mesure simultanée de l'élasticité hépatique et du paramètre CAP (pour *Controlled Attenuation Parameter* [8] en anglais). La sonde, originellement développée pour la mesure de la fibrose, permet l'évaluation simultanée de l'élasticité, corrélée à la fibrose, et du CAP, corrélé au pourcentage de stéatose. Le diagnostic d'une stéatose dès 11% d'infiltration lipidique, ainsi que la distinction des grades de sévérité de la stéatose devient ainsi possible par un examen échographique, non-opérateur-dépendant puisque la sonde contrôle jusqu'à la force appliquée par ce dernier lors de l'exa-

men. Cet outil s'est même révélé plus performant que les tests sérologiques pour la détection des stéatoses de bas grades [49] et permet l'évaluation de la stéatose sur un volume étant jusqu'à cent fois plus gros que celui d'une biopsie.

Malgré ces multiples développements, l'une des principales difficultés de l'examen échographique est la prise en charge de patients obèses, présentant une épaisse couche graisseuse sous-cutanée, rendant l'imagerie ultrasonographique compliquée et très peu résolue. Dans le cas de l'utilisation du Fibroscan® et du CAP, l'utilisation d'une sonde XL est alors nécessaire, permettant la mesure du CAP à une profondeur comprise entre 35 et 75 mm (contre 25-65 mm pour la sonde M). Cependant, l'examen reste difficile à appliquer chez certains patients souffrant d'obésité morbide.

Imagerie par tomodensitométrie

L'imagerie par tomodensitométrie (scanner-X ou *CT-scan* pour *Computed tomography* en anglais) est l'absorption des rayons X par les tissus. Son avantage est la visualisation précise de l'intégralité du foie, semblant faire de cette méthodologie un outil de choix pour le diagnostic de la stéatose sur la globalité de l'organe. L'imagerie par tomodensitométrie sans agent de contraste est la modalité la plus performante pour la détection d'une stéatose à partir du grade 2, soit une infiltration lipidique dépassant environ 30%, avec des valeurs de 82% et 100% pour la sensibilité et la spécificité, respectivement [48]. Plus le degré d'infiltration lipidique est élevé, plus l'absorption du foie est diminuée, entraînant un organe plus sombre sur l'image obtenue. Le diagnostic peut se faire par l'observation unique de l'absorption hépatique - une valeur inférieure à 40 unités de Hounsfield (UH) atteste de la présence de stéatose alors qu'une valeur de 50-57 UH est signe d'un organe sain -, par la différence entre l'absorption du foie et de la rate - une absorption hépatique dont la valeur est inférieure à celle de la rate par moins de 10 UH est signe de stéatose - ou par le ratio de la valeur d'absorption de la rate par rapport à celle du foie - un ratio inférieur à 0,8 diagnostique une stéatose [50] (figure 2.5). Des techniques d'acquisition avec l'utilisation d'agent de contraste ont été développées dans le but de limiter le temps d'exposition aux rayons X du patient. Cependant, le diagnostic de la stéatose est souvent biaisé en raison de la variabilité de la mesure en fonction de la quantité de produit injectée et du temps entre l'injection et l'acquisition [51].

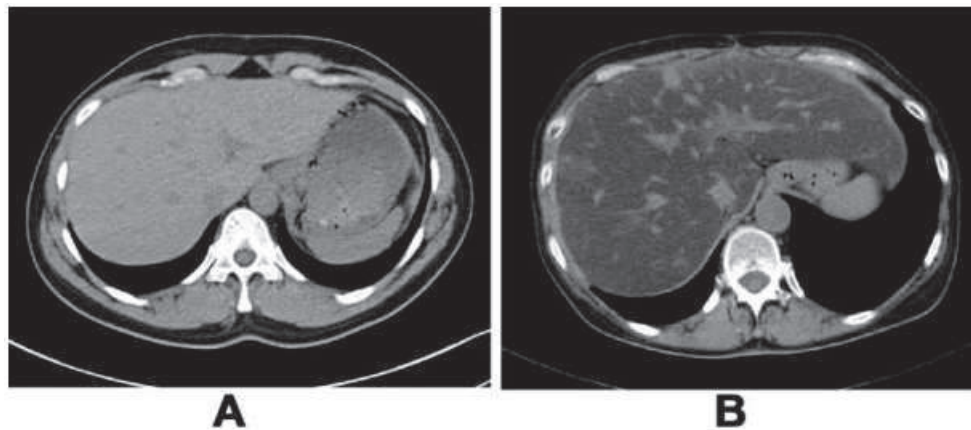


FIGURE 2.5 – Image tomodensitométrique acquise chez un patient sain (A), le foie apparaît en hypersignal et présente une absorption de 58 UH (rate : 46 UH), et chez un patient atteint de stéatose (B), la valeur d'absorption du foie est de 34 UH (rate : 41 UH). Source : Schwenger et al [48]

De manière générale, le caractère ionisant de l'imagerie par tomodensitométrie, en plus de la variabilité des mesures d'absorption en fonction des divers matériels utilisés, font que cette méthodologie n'est pas cliniquement acceptable pour le diagnostic de la stéatose. D'autant plus qu'une faible stéatose n'est pas détectable. Enfin, cette modalité d'imagerie ne permet pas la distinction entre une stéatose et d'autres maladies du foie affectant l'absorption du tissu hépatique. De plus, la présence simultanée de deux pathologies ayant un effet inverse l'une de l'autre sur la valeur d'absorption hépatique, rend le diagnostic compliqué. C'est le cas par exemple pour un patient souffrant simultanément d'une stéatose, diminuant l'absorption, et d'une hémochromatose, dont la surcharge en fer augmente l'absorption hépatique.

Imagerie et spectroscopie par résonance magnétique

A partir des paramètres magnétiques intrinsèques au tissu hépatique, notamment la différence de déplacement chimique (*cf* §1.1.2) entre l'eau et les lipides ainsi que la densité de proton, il est possible de quantifier la fraction lipidique, et donc de diagnostiquer une stéatose par les méthodes d'imagerie (IRM) et de spectroscopie (SRM) par résonance magnétique.

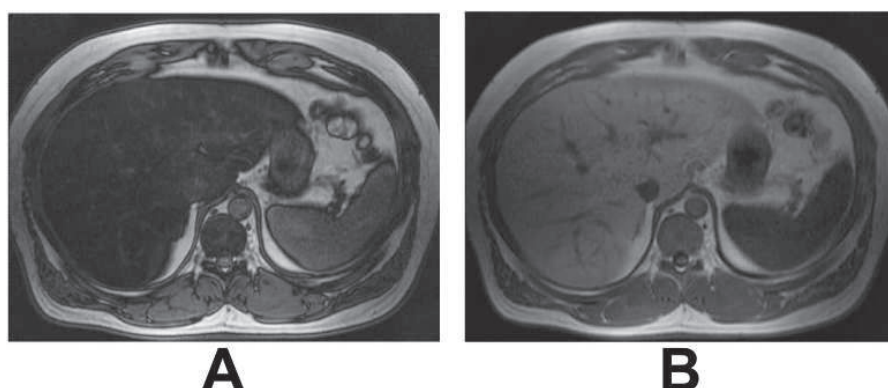


FIGURE 2.6 – Images obtenues par la méthode de Dixon chez un patient atteint de stéatose de grade 3 (fraction lipidique de 43%). (A) Acquisition en opposition de phase et (B) acquisition en phase. Source : Schwenzer et al [48]

En IRM, la principale méthode employée pour l'évaluation de la fraction lipidique a été présentée par Dixon *et al.* [52], utilisant la différence entre les fréquences de résonance de l'eau et de signal des protons des groupements méthylènes des lipides. Deux images sont acquises, l'une où ces signaux sont en phase, et l'autre où ils sont en opposition de phase, permettant le calcul de détermination de la fraction lipidique hépatique (figure 2.6). Cependant, dans le cas d'un grade avancé de stéatose, cette méthode ne permet pas de savoir quelle est la contribution majoritaire au signal entre l'eau et les lipides, entraînant un diagnostic erroné chez certains patients. Pour pallier ce problème, des études ont proposé l'utilisation de la méthode de Dixon à trois points, ajoutant donc une acquisition [53]. Si cela permet la distinction du vrai signal de l'eau et du vrai signal des lipides, l'inconvénient majeur est le temps d'acquisition ajouté, et donc la durée de l'apnée du patient. La méthode IDEAL (pour *Iterative Decomposition of water and fat with Echo Asymmetry and Least-squares estimation* en anglais) a été proposée par Reeder *et al.* [54–56], et permet une séparation des signaux de l'eau et des lipides en acquérant plusieurs images à différents temps d'écho, de manière rapide, et optimise les performances de rapport signal sur bruit afin de pallier la perte de signal par la pondération en T_2^* dans le cas d'une forte présence de fer dans le tissu hépatique (pour des patients atteints d'hémochromatose par exemple). Lorsqu'une correction en T_2^* est appliquée, l'évaluation de la fraction lipidique par densité de proton est réalisée par le calcul d'une image MRI-PDFF (pour *Magnetic Resonance Imaging - Proton Density Fat Fraction* en anglais) (figure 2.7). Cette technique présente de bons résultats pour le diagnostic d'une stéatose légère, en corrélation avec des résultats histologiques, avec une sensibilité et une spécificité de 90% et

91%, respectivement [57]. De plus le diagnostic n'est pas affecté par la présence d'autres pathologies [58].

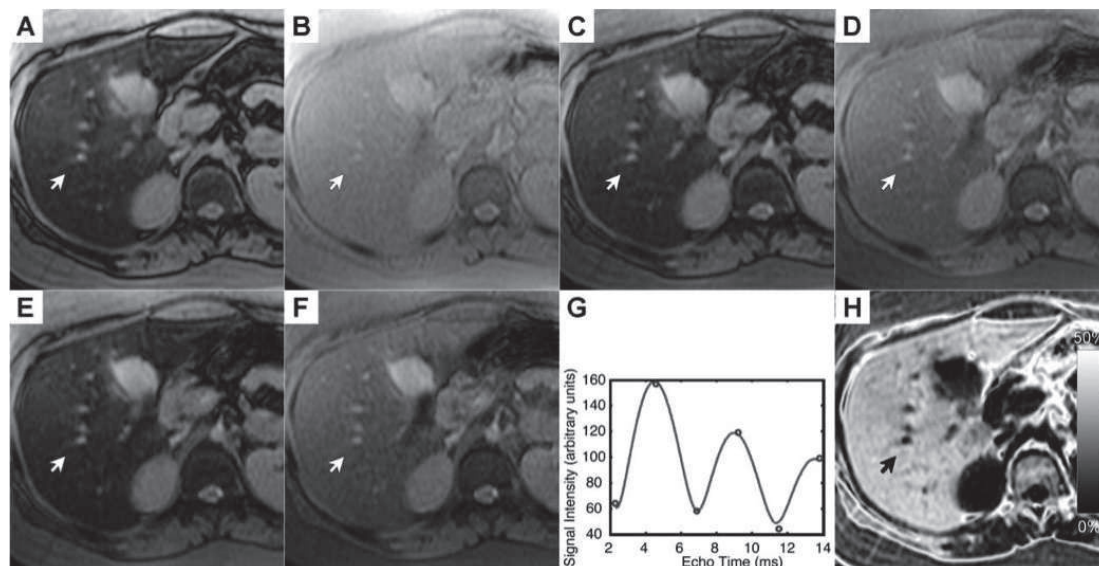


FIGURE 2.7 – Images issues de la séquence d'acquisition pour le calcul de la fraction lipidique hépatique (PDFF) chez une patiente présentant une stéatose de grade 3 (fraction lipidique de 39% mesurée par biopsie). (A-F) Images acquises avec différents temps d'écho. (G) Intensité du signal dans un pixel d'intérêt pour chaque temps d'écho utilisé. (H) Image obtenue par le calcul de la PDFF (valeur moyenne mesurée de 38%). Source : Tang et al [58]

En plus de l'imagerie, la résonance magnétique permet l'application de la spectroscopie. Le spectre obtenu est le reflet de la composition moléculaire de l'échantillon, ou du volume d'intérêt, dans lequel l'acquisition a été réalisée. Dans le cas des lipides, les différents groupements chimiques de la molécule d'acide gras résonnent à une fréquence qui leur est propre (*cf* §2.4.2 de ce chapitre), d'où l'observation de plusieurs résonances sur le spectre, à différents déplacements chimiques et d'amplitude variable en fonction de la quantité de ce groupement dans le volume d'intérêt (densité de proton). Par l'observation de la résonance associée au groupe lipidique majoritairement présent (à 1,3 ppm) et de la résonance de l'eau (à 4,7 ppm), la fraction lipidique est mesurée, permettant le diagnostic d'une stéatose dès le grade 1 (à partir de 5,56% [4]) en accord avec le contenu lipidique hépatique évalué à partir d'une biopsie [2]. En revanche, à la différence de l'IRM, la SRM n'évalue qu'un volume limité du tissu hépatique, allant de 1 cm³ à 27 cm³ en clinique. L'imagerie spectroscopique est une solution à l'observation du "foie entier" par spectroscopie, mais la résolution est amoindrie par rapport à une image acquise par IRM classique, et le temps d'acquisition très long (de l'ordre de 10 min contre

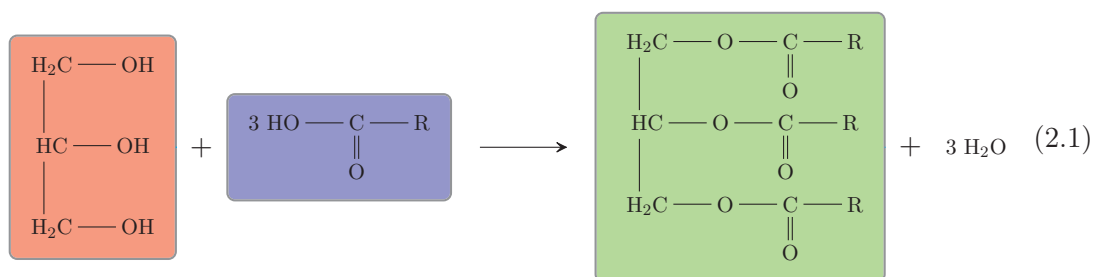
environ 2 min pour une acquisition de SRM SVS) la rend difficilement applicable dans un contexte clinique. De même, une acquisition en SRM SVS est plus longue qu'une acquisition standard en IRM, d'où une utilisation limitée de cette technique pour le diagnostic clinique de la stéatose.

Quant à la quantification de la fraction lipidique, la SRM ne semble pas apporter d'information supplémentaire par rapport à l'IRM. Cependant, la composition moléculaire détaillée du tissu analysé est observable sur un spectre de SRM, alors que ces informations ne sont pas accessibles à partir d'une acquisition d'IRM. C'est grâce à ces informations supplémentaires que la quantification de la composition lipidique, en différenciant les différents acides gras et leur proportion, peut être envisagée. Différentes méthodes de quantification de cette composition sont proposées dans la littérature (*cf* chapitre 4), mais leur application pour la quantification des lipides hépatiques est encore à l'étude dans le domaine pré-clinique.

En conclusion, les méthodes basées sur le principe physique de la résonance magnétique sont les plus appropriées pour le diagnostic d'une stéatose de manière non-invasive, puisque l'influence d'autres pathologies peut être corrigée et que la pathologie est détectable dès le grade 1. La composition détaillée des lipides hépatiques semble être une application de la SRM. Cette modalité non-invasive permettrait de remplacer la méthode biochimique de chromatographie en phase gazeuse à partir de biopsie, dans le cadre de la recherche d'un potentiel biomarqueur spécifique de la stéatose ou de l'évolution de la stéatose. Par exemple, une étude par chromatographie en phase gazeuse a mis en évidence une augmentation de la quantité de deux types d'acides gras (l'acide palmitique, acide gras saturé, et l'acide oléique, acide gras mono-insaturés; *cf* § dans la suite de ce chapitre pour leur définition) avec l'augmentation de la taille des gouttelettes lipidiques [59].

2.4 Triglycérides et acides gras

Au niveau hépatique, les acides gras (AG) sont stockés sous forme de molécules de triglycérides. Une molécule de triglycéride (en vert) est formée suivant la réaction chimique (équation 2.1) d'estérification entre une molécule de glycérol (en rouge) et trois molécules d'AG (en bleu). Pour simplifier, les trois AG utilisés dans l'équation 2.1 ont le même radical "R". En réalité, il est possible d'obtenir un triglycéride composé de trois AG différents (figure 2.8).



Les AG sont des acides carboxyliques dont la chaîne carbonée, aliphatique linéaire, compte un nombre pair de carbones compris entre quatre et trente-six atomes, et peut présenter des doubles liaisons. C'est en fonction de ces doubles liaisons qu'est effectuée la classification des AG.

2.4.1 Classification

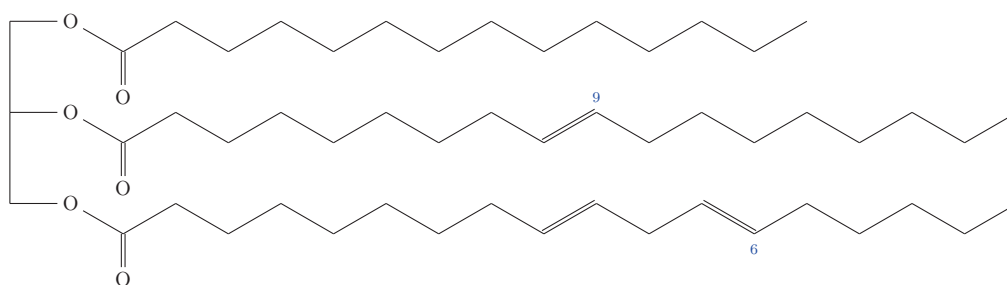


FIGURE 2.8 – Exemple de molécule de triglycéride formée de trois chaînes d'AG différentes. La chaîne supérieure est l'acide palmitique, AG saturé long de quatorze atomes de carbone, noté 14 : 0. La chaîne centrale est l'acide oléique, AG insaturé long de dix-huit atomes de carbone et présentant une double liaison (mono-insaturé) en position 9, noté 18 : 1 $n - 9$. La chaîne inférieure est l'acide linoléique, AG insaturé long de dix-huit atomes de carbone et présentant deux doubles liaisons (poly-insaturé ou di-insaturé) dont la première est en position 6, noté 18 : 2 $n - 6$.

Les AG les plus courants ont un nom particulier qui leur est attribué tel que l'acide palmitique, ou l'acide oléique par exemple. Cependant, lors des études biochimiques de la composition en AG des lipides hépatiques, les nomenclatures biochimique et "en oméga" sont utilisées. Un AG sera donc noté $C : D \ n - x$ où C désigne le nombre d'atomes de carbone de la chaîne, D le nombre de doubles liaisons et x la position de la première double liaison à partir du groupement méthyl (CH_3) terminal de la molécule d'AG, d'après la nomenclature "en oméga" (figure 2.8). Ainsi l'acide palmitique et l'acide oléique sont désignés par 16 : 0 et

18 : 1 $n - 9$, respectivement.

De manière générale, les AG sont regroupés en fonction de la présence ou non de double liaison sur leur chaîne carbonée : les acides gras insaturés (AGI) ou saturés (AGS), respectivement. Au sein des AGI, deux sous-groupes sont pris en compte : les acides gras mono-insaturés (AGMI) et poly-insaturés (AGPI), présentant une et plusieurs doubles liaisons, respectivement. Parmi les AGPI, il est courant de distinguer les plus fréquents lorsque l'on travaille au niveau des triglycérides hépatiques : les ω_6 , présentant un minimum de deux doubles liaisons dont la première est sur le sixième carbone suivant la nomenclature "en oméga", et les ω_3 , ou présentant un minimum de trois doubles liaisons dont la première est sur le troisième carbone suivant la nomenclature "en oméga".

D'après des études biochimiques à partir de biopsies hépatiques chez des patients [59, 60] et chez la souris [61–63], les AG détectés présentent une chaîne carbonée allant de quatorze à vingt-deux carbones, et de zéro à six doubles liaisons. Les différents AG sont donc : 14 : 0, 14 : 1 $n - 7$, 16 : 0, 16 : 1 $n - 7$, 18 : 0, 18 : 1 $n - 9$, 18 : 2 $n - 6$, 18 : 2 $n - 3$, 20 : 4 $n - 6$, 20 : 5 $n - 3$ et 22 : 6 $n - 3$. Or, il est important de faire la distinction entre une détection et une quantification des AG faite sur la totalité des lipides hépatiques, et donc incluant notamment les phospholipides membranaires, et une détection et quantification sur les triglycérides hépatiques qui seront les seuls visibles par SRM *in vivo* du fait de la faible mobilité des phospholipides (T_2 très court). De cette façon, parmi les AG précédents, ceux présentant les plus longues chaînes carbonées et plus de trois doubles liaisons ne sont pas à prendre en compte lors de la quantification de la composition des lipides hépatiques (et donc triglycérides) par SRM [60].

2.4.2 Nomenclature utilisée en SRM

Un spectre de RMN est constitué de "pics" correspondant aux résonances des métabolites présents dans l'échantillon observé. La position de chaque résonance est connue et appelée déplacement chimique, correspondant à la différence de fréquence de résonance entre le métabolite concerné et celui dont la résonance est prise comme référence lors de l'acquisition. Dans le cas de l'observation des lipides, et plus précisément des AG constituant les triglycérides dans notre cas, du fait de la taille importante d'une molécule d'AG, chaque résonance ne correspond pas à un AG mais à un groupement chimique constituant la molécule. La corres-

pondance entre les résonances présentes sur un spectre de SRM de lipides et les groupements chimiques associés est présentée par la figure 2.9. La nomenclature utilisée est celle issue du logiciel *LCModel* (Version 6.3-0L, Stephen Provencher, Oakville, ON, Canada) [64] qui a été utilisé lors des études présentées dans ce manuscrit. L'AG utilisé comme exemple est l'acide linoléique (AG insaturé présentant deux doubles liaisons) car il présente tous les groupements chimiques détectables par SRM *in vivo*.

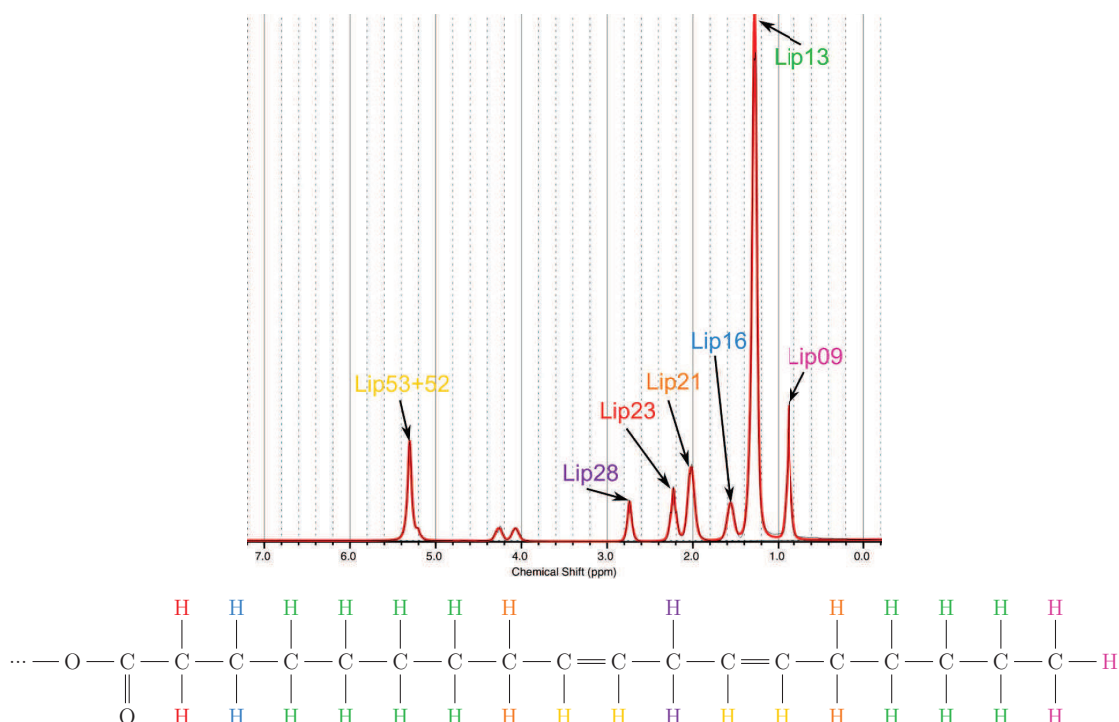


FIGURE 2.9 – Spectre acquis à 4,7 T dans un tube d’huile de tournesol. La nomenclature utilisée par le logiciel *LCModel*, et dans la suite de ce manuscrit, est indiquée par une flèche pour chaque résonance. Chaque résonance est associée au groupement chimique, présent sur la molécule d’AG, correspondant à la même couleur utilisée pour le nom de la résonance et les protons de la molécule. L’AG utilisé pour l’exemple est l’acide linoléique (18 : 2 $n - 6$). La liaison avec la chaîne de glycérol du triglycéride auquel l’AG est rattaché est symbolisée par les points en début de molécule.

Par l’étude de relations entre les différentes résonances les unes par rapport aux autres, suivant des méthodes proposées dans la littérature (*cf* chapitre 4), il est possible de déterminer les quantités relatives de chaque type d’AG (AGS, AGI, AGMI et AGMI) composant les lipides du volume d’intérêt. On remarque que la résonance *Lip28*, correspondant au groupement méthylène entouré de deux doubles liaisons, ne sera présent que sur des molécules d’AG présentant au moins

deux insaturations, permettant la distinction entre les AG mono-insaturés et poly-insaturés. Dans le cas d'un échantillon contenant très peu d'AGPI par rapport aux autres types d'AG, l'amplitude de la résonance *Lip28* sera beaucoup plus faible, par exemple.

Pour les travaux présentés dans ce manuscrit, le logiciel *LCModel*, véritable boîte noire de traitement du signal de SRM, a été préféré au logiciel *jMRUI v5.0* [65, 66], qui est aussi très utilisé dans la littérature. Ce choix pour le logiciel *LCModel* se justifie puisque l'apport par l'utilisateur de connaissances *a priori* n'y est pas nécessaire, pour la quantification des signaux complexes des résonances associées aux lipides, le traitement des données s'en retrouve simplifié tout en étant robuste et non-opérateur-dépendant.

Chapitre 3

Effet de la suppression du signal de l'eau sur la quantification des lipides hépatiques

Sommaire

3.1	Animaux, patients et protocole expérimental	59
3.1.1	Animaux et patients	59
3.1.2	Protocole expérimental	60
3.2	Analyses préliminaires	64
3.2.1	Evaluation de la qualité spectrale	65
3.2.2	Validation du protocole d'acquisition	67
3.2.3	Evaluation de la qualité globale de l'ajustement du modèle sur les données brutes	73
3.3	Evaluation de l'effet de la suppression du signal de l'eau	76
3.3.1	La valeur de CRLB, paramètre de la qualité de la quantification	77
3.3.2	Evaluation de l'impact de la suppression du signal de l'eau au voisinage de la résonance de l'eau	81
3.3.3	Quantification de la composition des lipides hépatiques	82
3.4	Discussion	83
3.5	Conclusion	87

L'importance de l'information métabolique apportée par la quantification des lipides hépatiques, a fait de la SRM une méthode de choix pour la recherche dans ce domaine. Or, lors d'études pré-cliniques et cliniques, ayant pour objectif la quantification de la fraction lipidique (FL) ou de la composition en AG des lipides hépatiques, le protocole d'acquisition peut utiliser un spectre, acquis sans suppression du signal de l'eau [2, 4, 10, 11, 18, 67, 68], ou deux spectres, l'un sans et l'autre avec suppression du signal de l'eau [3, 15, 20, 26, 69–73]. Si ces deux méthodologies sont utilisées dans la littérature, ni l'une ni l'autre n'a valeur de référence et, à ce jour, aucune étude n'a proposé de comparaison qualitative et/ou quantitative de ces protocoles d'acquisition.

L'objectif du travail présenté dans ce chapitre a donc été d'évaluer de façon quantitative l'effet de la suppression du signal de l'eau sur la quantification des résonances associées aux lipides hépatiques. Pour cette évaluation, le logiciel *LCModel* (Version 6.3-0L, Stephen Provencher, Oakville, ON, Canada) [64] a été utilisé pour le traitement des données pré-cliniques et cliniques. Les analyses ont été réalisées sur des spectres de SRM acquis *in vivo* à 4,7 T chez des souris, obèses ou non, et à 3,0 T chez des patients suspectés de présenter une stéatose.

Un article présentant les résultats de notre étude a été accepté par le journal "*Magnetic Resonance in Physics, Biology and Medicine*" (Annexe A).

3.1 Animaux, patients et protocole expérimental

3.1.1 Animaux et patients

Quinze souris femelles (c57BL/6JRj), âgées de cinq semaines, ont été utilisées pour cette étude, dont neuf obèses (ob/ob et db/db) (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France). Ces animaux ont initialement été utilisés dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Bernard FROMENTY (Unité Foie, Métabolisme, Cancer ; INSERM UMR991) sur l'étude des effets hépatiques du paracétamol chez des populations obèses présentant une stéatose. Notre étude méthodologique sur l'effet de la suppression du signal de l'eau a été réalisée parallèlement, en profitant de ces données *in vivo*. L'anesthésie a été réalisée par injection intra-péritonéale d'un mélange de kétamine (55 mg/kg) et de xylazine (5,5 mg/kg). Dans le but d'obtenir différents niveaux d'infiltration de lipides hépatiques, de faible ou modéré à sévère, trois acquisitions de SRM ont été effectuées sur chaque souris à trois stades différents du protocole (jour 0, 14 et 28), d'où un total de 45 spectres acquis.

Onze patients ($\text{âge} = 49 \pm 12$ ans) suspectés de présenter une stéatose ont été inclus dans l'étude clinique (CHU de Pontchaillou, Rennes). Là encore, nous avons pu bénéficier, pour notre étude méthodologique, de données cliniques issues du suivi médical de ces onze patients lors d'une collaboration avec l'équipe du professeur Yves GANDON (département de Radiologie du CHU de Pontchaillou à Rennes) et du docteur Elise BANNIER (équipe VisAGeS ; INSERM U746). Un seul examen de SRM a été effectué sur chaque patient.

Toutes les expérimentations, pré-cliniques et cliniques, ont été approuvées par le comité local d'éthique animale et le comité d'examen institutionnel respectivement.

3.1.2 Protocole expérimental

Protocole pré-clinique d'acquisition de SRM *in vivo*

Les acquisitions sur modèles murins ont été réalisées à 4,7 T en utilisant un spectromètre imageur dédié au petit animal (47/40 USR Bruker Biospec, Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen, Germany) avec un canon de gradient BGA12 (force maximum de 400 mT/m) et une bobine RF volumique de 72 mm de diamètre interne. Toutes les acquisitions ont été synchronisées avec la fréquence respiratoire de chaque animal.

Pour la localisation anatomique, des images RARE multi-coupes pondérées en T_1 (RARE : *Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement* [74] en anglais) ont été acquises avec les paramètres suivants (durée de l'acquisition = 2 min) :

- $TR = 900$ ms ;
- $TE = 11,7$ ms ;
- nombre de coupes = 20 ;
- épaisseur de coupe = 1 mm ;
- champ de vue = 5×5 cm² ;
- matrice = 192x192 ;
- nombre d'accumulations = 3.

La séquence PRESS (*cf* §1.2.1 du chapitre 1) a été utilisée pour les acquisitions de SRM dans un voxel d'intérêt (VOI) de $3 \times 3 \times 3$ mm³ positionné dans le lobe droit du foie. Pour chaque souris, deux spectres ont été acquis. Le premier a été acquis sans suppression du signal de l'eau (noWS), avec les paramètres suivants (durée de l'acquisition ≈ 4 min 30 s) :

- $TR = 4000$ ms ;
- $TE = 11$ ms ;

- nombre d'accumulations = 64 ;
- nombre de "dummy scans" = 4.

Le second a été acquis avec suppression du signal de l'eau (WS), et les paramètres (durée de l'acquisition \approx 4 min 30 s/11 min pour les souris obèses/contrôles) :

- $TR = 2500$ ms ;
- $TE = 11$ ms ;
- nombre d'accumulations = 64/256 pour les souris obèses/contrôles ;
- nombre de "dummy scans" = 4.

Le module de suppression du signal de l'eau VAPOR (*cf* §1.2.2 du chapitre 1) a été utilisé pour les acquisitions avec suppression du signal de l'eau, avec une bande passante de 150 Hz. Un ajustement manuel des gains des impulsions de suppression du signal de l'eau a été réalisé pour chaque souris afin d'optimiser la suppression de la résonance de l'eau.

Protocole clinique d'acquisition de SRM *in vivo*

Il est à noter que, ces acquisitions ayant été réalisées dans le cadre d'un suivi clinique des patients, le protocole utilisé n'a pu être modifié pour notre étude méthodologique.

Les acquisitions cliniques ont été réalisées avec un spectromètre imageur de 3,0 T (Verio, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany) utilisant une bobine RF thorax à 32 canaux pour la réception. Pour la localisation anatomique, la séquence HASTE (HASTE : *Half-Fourier Acquisition Single-shot Turbo Spin Echo* [75] en anglais) a été utilisée pour acquérir des images multi-coupes pondérées en T_2 avec les paramètres suivants (durée de l'acquisition = 2 min) :

- $TR = 1000$ ms ;
- $TE = 96$ ms ;
- nombre de coupes = 30 ;
- épaisseur de coupe = 5 mm ;
- champ de vue = 38x28 cm² ;
- résolution spatiale = 1,5x1,2 mm².

La séquence STEAM a été utilisée pour les acquisitions de SRM dans un voxel d'intérêt de 30x30x30 mm³ placé dans le lobe droit du foie de chaque patient, en évitant les gros vaisseaux sanguins. Comme dans le cas des acquisitions pré-cliniques, deux spectres ont été acquis sur chaque patient. Le premier sans suppression du signal de l'eau (noWS), le second (WS) avec l'utilisation du module de suppression du signal de l'eau WET et les paramètres d'acquisition suivants

(durée de l'acquisition = 10 s) :

- $TR = 4000$ ms ;
- $TE = 20$ ms ;
- nombre d'accumulations = 2.

Pour chaque acquisition de SRM, il a été demandé au patient de retenir sa respiration. Contrairement aux acquisitions pré-cliniques, aucun ajustement du module de suppression du signal de l'eau WET n'a été effectué lors de ces acquisitions.

Traitement des données spectrales

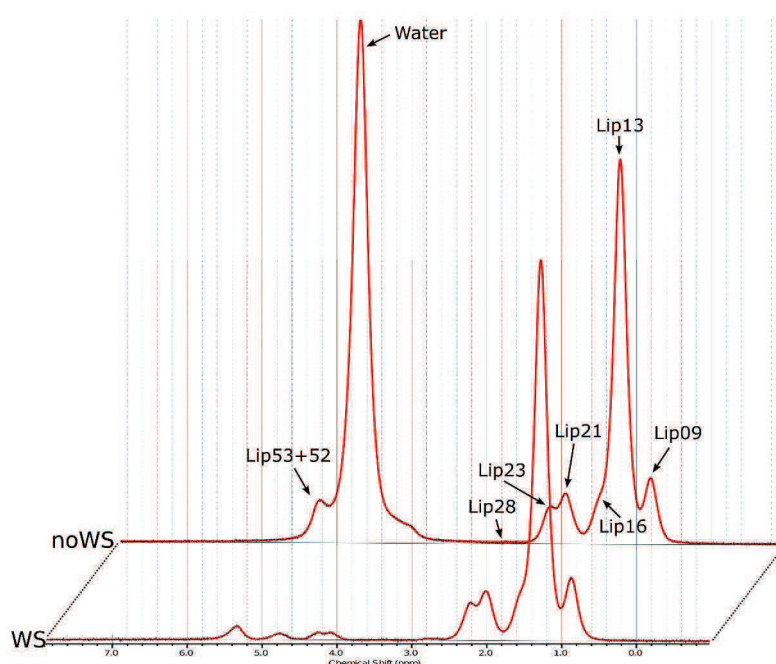


FIGURE 3.1 – Spectres de SRM acquis, sans (*noWS*) ou avec (*WS*) suppression du signal de l'eau, sur le foie d'une souris présentant une forte fraction lipidique ($FL = 36,5\%$). Chaque résonance d'intérêt est indiquée par une flèche sur le spectre sans suppression du signal de l'eau (*noWS*). La faible amplitude de la résonance de l'eau présente sur le spectre *WS* atteste d'une bonne suppression du signal de l'eau par le module VAPOR.

Tous les spectres, pré-cliniques et cliniques, ont été traités avec le logiciel *LC-Model* sans introduction de connaissances *a priori*. Neuf résonances associées aux lipides ont été identifiées, mais seules sept de ces résonances ont été utilisées dans cette étude (figure 3.1), celles correspondant aux protons de la chaîne de glycérol ne présentant pas d'intérêt ici. La résonance *Lip13* (correspondant aux protons des groupements $(CH_2)_n$ à 1,3 ppm) est la résonance principale des lipides et est équivalente à environ 70% de leur signal total. C'est pourquoi elle est souvent utilisée

pour quantifier le contenu lipidique total, ou FL. Les autres résonances attribuées aux lipides, à l'exception des résonances *Lip41* et *Lip43* (à 4,1 et 4,3 ppm, respectivement) correspondant à la chaîne de glycérol, fournissent une information sur la composition lipidique [18, 20, 69].

Pour modéliser les résonances des lipides présentes sur les spectres, le logiciel *LCModel* utilise une combinaison variable de courbes gaussiennes et lorentziennes. Ainsi, pour chaque résonance, *LCModel* fournit :

1. la "concentration", mesurée comme l'aire sous la courbe de la résonance concernée ;
2. la borne de Cramér-Rao (CRLB), donnant une estimation de la fiabilité de la mesure.

Pour la suite de cette étude, seuls les spectres dont les valeurs de CRLB relevées pour chacune des résonances d'intérêt étaient inférieures à 10% (*cf* §3.2.2 page 68) ont été utilisés. Ainsi, pour les données pré-cliniques, sur les 45 couples de spectres (sans et avec suppression du signal de l'eau) à notre disposition, 38 ont été exploitables. Pour les données cliniques, les 11 couples de spectres (sans et avec suppression du signal de l'eau) ont été exploitables.

Calcul de la fraction lipidique et définition des sous-groupes

La FL a été calculée, à partir des spectres acquis sans suppression du signal de l'eau, comme étant le rapport entre l'aire sous la courbe de la résonance *Lip13* et la somme de l'aire sous la courbe du signal de l'eau et de cette résonance [4] :

$$FL(\%) = 100. \frac{[Lip13]}{[Lip13] + [Eau]} \quad (3.1)$$

En prenant en compte un seuil de 15% pour la FL (stéatose de grade 1), les données pré-cliniques et cliniques ont chacune été séparées en deux sous-groupes : le sous-groupe avec une haute fraction lipidique (HFL, $FL \geq 15\%$) et le sous-groupe avec une faible fraction lipidique (FFL, $FL < 15\%$). Le seuil de 15% a été choisi en rapport avec la documentation du logiciel *LCModel*. L'utilisation d'un unique spectre sans suppression du signal de l'eau y est conseillée pour l'évaluation de la FL de manière générale, et si la FL de l'échantillon observé dépasse 15%.

Pour les données pré-cliniques : le sous-groupe HFL a compris vingt-cinq spectres, avec une valeur moyenne de FL de $26,9 \pm 5,5\%$; le sous-groupe FFL a compté treize spectres, avec une valeur moyenne de FL de $1,6 \pm 0,5\%$.

Concernant les données cliniques : le sous-groupe HFL a compris cinq spectres, avec une valeur moyenne de FL de $27,6 \pm 7,8\%$; le sous-groupe FFL a compté six spectres, avec une valeur moyenne de FL de $6,0 \pm 3,5\%$.

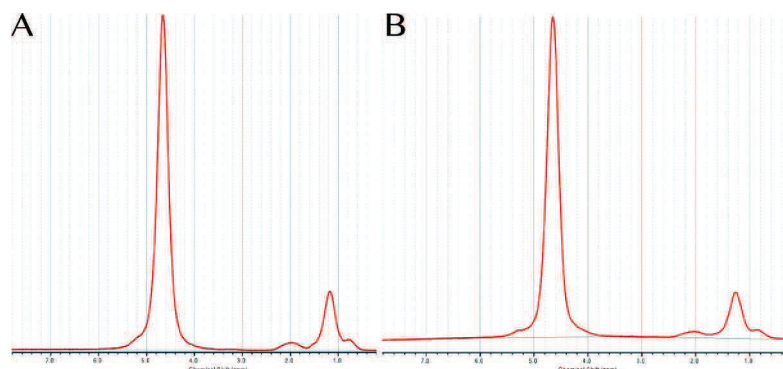


FIGURE 3.2 – Spectres de SRM, traités avec le logiciel LCModel, acquis sans suppression du signal de l'eau (A) à 4,7 T dans le foie d'une souris avec une fraction lipidique de 15% et (B) à 3,0 T dans le foie d'un patient présentant une fraction lipidique de 13%.

La figure 3.2 présente des spectres de SRM acquis dans le foie d'une souris à 4,7 T (figure 3.2, A) et dans le foie d'un patient à 3,0 T (figure 3.2, B) avec une infiltration de lipides modérée (FL $\approx 15\%$). Les caractéristiques spectrales de ces deux acquisitions étant comparables, il apparaît cohérent d'utiliser la même stratégie d'acquisition pour des études de SRM pré-cliniques et cliniques dans le foie, à ces valeurs de champ magnétique.

3.2 Analyses préliminaires

Lors de cette étude, des travaux préliminaires à l'évaluation de l'effet de la suppression du signal de l'eau sur la quantification des résonances lipidiques ont été réalisés dans le but de vérifier la qualité spectrale des données utilisées, d'une part, et la validité de ces données pour l'objectif principal de ce type d'acquisitions, à savoir la quantification de la composition lipidique, d'autre part. Lors de l'analyse d'un spectre de SRM, deux résultats permettent d'évaluer les données brutes : le rapport signal-sur-bruit (SNR : *Signal to Noise Ratio* en anglais), rapport entre l'amplitude maximale du signal d'intérêt et le bruit présent, et la largeur à mi-hauteur (FWHM : *Full Width Half Maximum* en anglais) de la résonance principale

(ici il s'agit de la résonance de l'eau). En ce qui concerne l'ajustement de ces données, c'est à dire la quantification des résonances, c'est par l'analyse des valeurs de CRLB et du résidu que sa précision est vérifiée. Dans la suite de cette partie, ces paramètres sont utilisés pour :

1. évaluer la qualité spectrale (FWHM moyenne observée, estimation du bruit avec ou sans suppression du signal de l'eau) ;
2. vérifier la validité du protocole d'acquisition pour la quantification des résonances lipidiques (observation combinée du SNR, de la FWHM et des valeurs de CRLB) ;
3. effectuer une mesure globale de la qualité de l'ajustement (déviations standard du résidu par rapport au signal de SRM ajusté).

3.2.1 Evaluation de la qualité spectrale

Mesure de la *Full Width at Half Maximum* (FWHM)

Les valeurs moyennes de FWHM relevées pour les sous-groupes HFL pré-clinique (n=25) et clinique (n=5) sont égales à 53 ± 7 Hz et 46 ± 18 Hz, respectivement. Pour les sous-groupes FFL pré-clinique (n=13) et clinique (n=6), les valeurs moyennes de FWHM sont de 59 ± 13 Hz et 32 ± 9 Hz, respectivement. Ces valeurs sont en accord avec les valeurs observées dans la littérature, où, dans la majorité des cas les valeurs de FWHM sont inférieures à 50 Hz [69, 70, 76], notamment pour les données pré-cliniques à 4,7 T [20]. Les études pré-cliniques présentant une FWHM moyenne plus faible que pour nos données sont, le plus souvent, effectuées à plus haut champ magnétique (à 7,0 T [69]). D'autre part, lors d'acquisitions effectuées chez le rat, l'utilisation d'un voxel plus volumineux (voxel de 1200 mm³ [70] ou 125 mm³ [69] contre 27 mm³ dans notre étude) permet l'obtention d'un SNR plus élevé pouvant mener à une meilleure résolution spectrale.

Estimation du bruit

Lors de l'analyse des spectres acquis avec suppression du signal de l'eau, une nette diminution du rapport signal sur bruit (SNR) a été observée. Le SNR étant calculé comme le rapport de l'amplitude maximale du spectre sur le niveau de bruit :

$$SNR = \frac{\text{Amplitude max}}{\sigma}, \quad (3.2)$$

avec l'amplitude maximale et σ (la déviation standard du bruit) exprimée en unité arbitraire. Deux hypothèses sont à considérer pour expliquer cette diminution du SNR :

1. une augmentation du niveau de bruit induite par le module de suppression du signal de l'eau ;
2. une diminution du signal d'intérêt.

Puisque le module de suppression cible la résonance de l'eau, c'est-à-dire la résonance principale d'un spectre acquis dans le foie, il est évident que l'amplitude du signal d'intérêt soit diminuée après l'application de cette suppression. Cependant, il semble important, en raison du questionnement proposé dans ce chapitre, de vérifier qu'une augmentation du bruit ne soit pas provoquée par l'utilisation de la suppression du signal de l'eau.

La valeur de σ a été calculée pour chaque spectre du sous-groupe HFL pré-clinique ($n=25$). Pour ce faire, l'amplitude de la résonance de l'eau a été mesurée sur le spectre acquis sans suppression du signal de l'eau et divisée par la valeur de SNR indiquée par *LCModel*, puis, l'amplitude de la résonance *Lip13* a été mesurée sur le spectre acquis sans suppression du signal de l'eau et divisée par la valeur de SNR indiquée par *LCModel* pour le spectre avec suppression du signal de l'eau. La mesure de l'amplitude de la résonance *Lip13* a été faite sur le spectre sans suppression du signal de l'eau afin de travailler avec la même échelle d'amplitude, et ainsi obtenir des valeurs de bruit comparables (les amplitudes étant exprimées en unité arbitraire par *LCModel*). De cette façon, les valeurs moyennes de niveau de bruit mesurées sont : 163 ± 31 (u.a.) et 179 ± 44 (u.a.) pour les spectres acquis sans et avec suppression du signal de l'eau, respectivement. Les valeurs de niveau de bruit observées sont comparables sans ou avec suppression du signal de l'eau. Il paraît cohérent d'émettre l'hypothèse que le module VAPOR n'implique pas de bruit supplémentaire lors de l'acquisition au niveau du foie pour les données pré-cliniques.

Le niveau de bruit, pour le sous-groupe FFL pré-clinique, n'a pas pu être estimé en raison de la très faible fraction lipidique de ces animaux, et donc de la très basse amplitude de la résonance *Lip13*, la rendant difficile à mesurer de manière précise. D'autre part, ces mesures n'ont pas pu être effectuées non plus sur les données cliniques car la suppression du signal de l'eau utilisée (module WET sans ajustement manuel) ne produit bien souvent qu'une suppression partielle du signal

de l'eau. Ceci implique une résonance de l'eau plus élevée que la résonance *Lip13* associée aux lipides sur certains spectres. De ce fait, le SNR calculé sur les spectres acquis avec suppression du signal de l'eau n'est pas toujours évalué sur la même résonance, d'où une comparaison impossible des données entre elles.

3.2.2 Validation du protocole d'acquisition

Les acquisitions de SRM de cette étude ayant pour objectif la quantification de la composition des lipides hépatiques *in vivo*, il est intéressant et important de vérifier que les spectres obtenus permettent un ajustement précis des courbes simulées des résonances lipidiques sur les données brutes. Ceci a été fait en comparant les valeurs de CRLB calculées par le logiciel *LCModel*, pour chacune des résonances d'intérêt, avec la valeur de SNR et de FWHM du spectre concerné. Dans la suite de ce paragraphe, les résultats obtenus sur le groupe pré-clinique sont présentés. Les données cliniques étant moins nombreuses, l'ajout de leur représentation graphique dans ce manuscrit ne nous a pas semblé essentiel, car n'apportant pas d'information nécessaire à la compréhension et à l'illustration de la validation du protocole d'acquisition. De plus, le module de suppression d'eau n'ayant pas été optimisé lors des acquisitions cliniques, l'amplitude du signal de l'eau reste supérieure à celle de la résonance majeure des lipides de la quasi-totalité des spectres, entraînant un biais dans le calcul des paramètres SNR et FWHM de ces spectres.

Evaluation de la qualité de l'ajustement du modèle sur les données brutes en fonction de la valeur de SNR

L'augmentation du SNR étant un marqueur de l'amélioration du signal acquis, et donc une augmentation de la qualité spectrale de nos spectres, il est intuitif de s'attendre à une diminution des valeurs de CRLB mesurées lors de la quantification des résonances lipidiques. Une décroissance des CRLB de type exponentielle a été observée lors d'études précédentes effectuées au niveau cérébral [77–79]. Il est alors possible de déterminer la valeur de SNR minimale permettant une quantification suffisamment précise des résonances d'intérêt pour une étude spécifique.

Les représentations graphiques de la valeur de CRLB relevée pour la résonance *Lip13* en fonction du SNR, pour les deux sous-groupes pré-cliniques (HFL et FFL), ne seront pas présentées en raison des très faibles valeurs obtenues (1 à 2% pour le sous-groupe HFF et 2 à 10% pour le sous-groupe LFF) pour toutes nos valeurs de SNR. Cette résonance est donc quantifiée de manière robuste dans nos conditions

expérimentales.

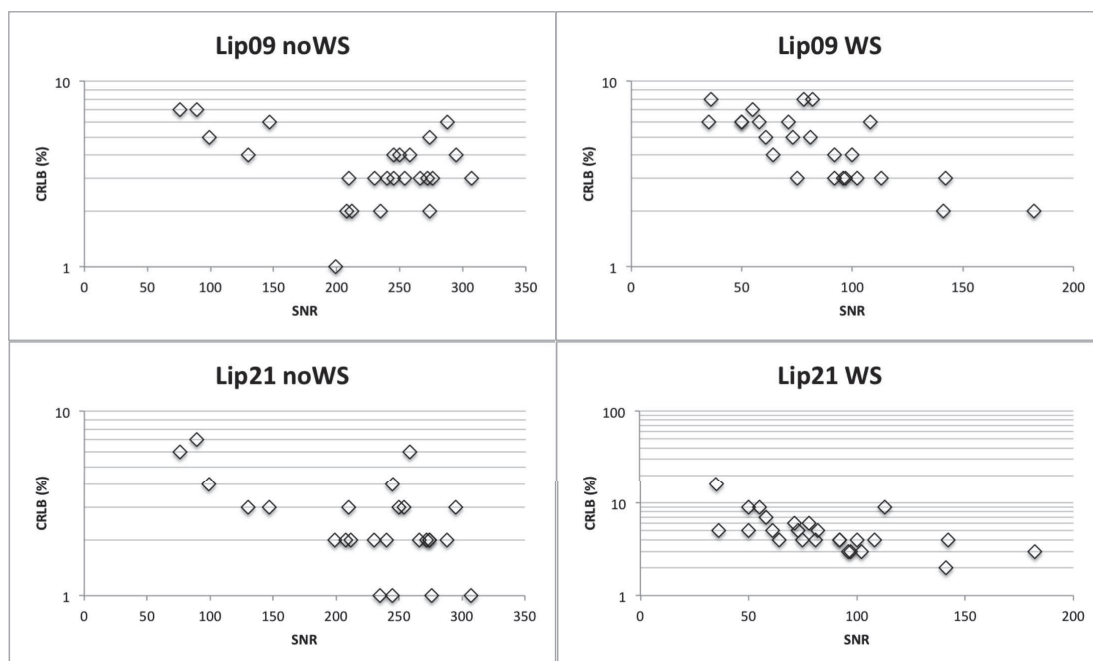


FIGURE 3.3 – Représentations graphiques des valeurs de $CRLB$ en fonction du SNR mesurés pour les résonances *Lip09* et *Lip21* quantifiées sur les spectres acquis sans (*noWS*) ou avec (*WS*) suppression du signal de l'eau, pour le sous-groupe *HFL* pré-clinique ($n=25$).

Les valeurs de $CRLB$ associées aux valeurs de SNR , pour les résonances *Lip09* et *Lip21* du sous-groupe *HFL* pré-clinique, sont représentées sur la figure 3.3. Une tendance exponentielle décroissante de la valeur de $CRLB$ en fonction du SNR est observée pour chacun des graphiques présentés. Sur chaque graphique, la valeur de SNR ne descend pas sous 50, à l'exception de deux valeurs pour la résonance *Lip09* obtenues sur les spectres avec suppression du signal de l'eau. De plus, à l'exception d'un point sur le graphique correspondant aux données issues des spectres acquis avec suppression du signal de l'eau pour la résonance *Lip21*, toutes les valeurs de $CRLB$ sont inférieures à 10%. Au dessus de ce seuil, la précision de la quantification de la résonance par le logiciel *LCModel* est considérée comme insuffisante pour l'exploitation des données qui en sont issues. La documentation de *LCModel* propose l'utilisation d'un seuil placé à 5% du fait que, lors de l'étude de spectres de lipides, la quantification des résonances lipidiques se fait à partir de données empiriques issues d'une base simulée utilisant des combinaisons de gaussiennes et lorentziennes. Ceci ayant pour effet une sous-estimation du paramètre $CRLB$ par rapport au calcul effectué pour le traitement d'un spectre acquis sur

le cerveau à partir d'une base réelle (le seuil utilisé dans ce cas est $CRLB < 15\%$). Cependant, pour notre étude, le choix d'un seuil placé à 10% a été fait, faisant l'hypothèse que la valeur de 5% était une limite semblant exagérée et difficile à atteindre pour toutes les résonances lipidiques d'intérêt. Nos résultats mettent en évidence que pour la quantification des résonances lipidiques dans nos conditions expérimentales, un SNR de 50 est suffisant pour le sous-groupe HFL. Si une précision supérieure est souhaitée, par exemple $CRLB < 5\%$, la valeur minimale de SNR nécessaire sera de 100.

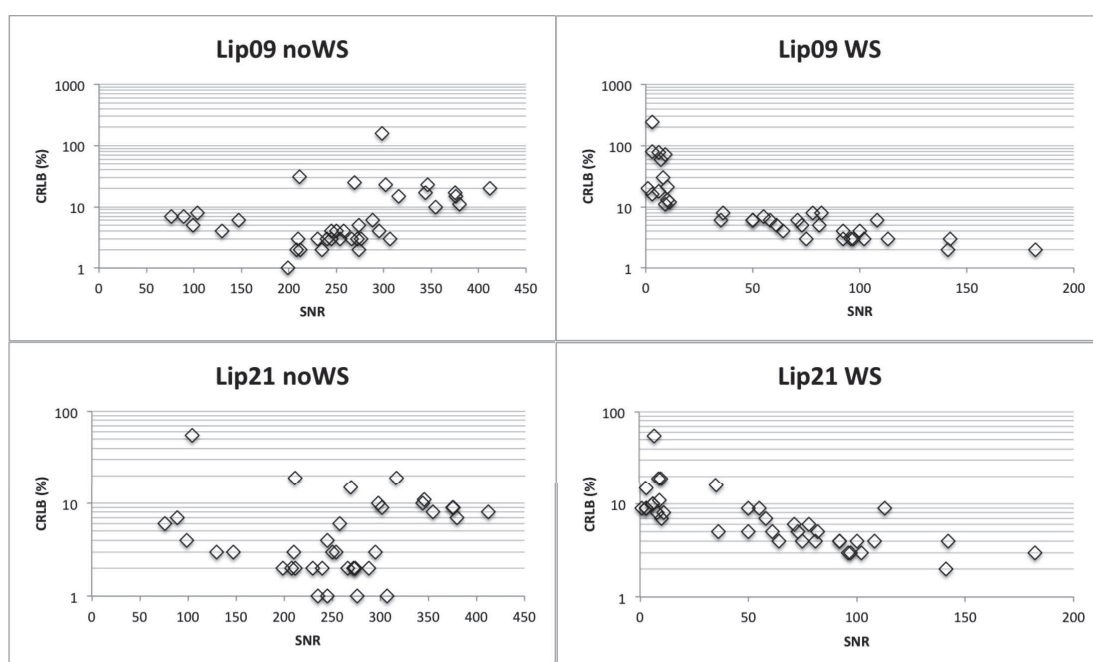


FIGURE 3.4 – Représentations graphiques des valeurs de $CRLB$ en fonction du SNR mesurés pour les résonances *Lip09* et *Lip21* quantifiées sur les spectres acquis sans (*noWS*) ou avec (*WS*) suppression du signal de l'eau, pour les sous-groupes HFL et FFL pré-cliniques ($n=38$).

Les données du sous-groupe FFL, pour les résonances *Lip09* et *Lip21*, ont été utilisées afin d'illustrer des résultats obtenus pour des valeurs de SNR plus faibles, notamment avec l'utilisation de la suppression du signal de l'eau en présence d'une quantité très faible de lipides (figure 3.4). Sans suppression du signal de l'eau, le SNR est calculé à partir de la résonance de l'eau, toujours très présente que ce soit pour le sous-groupe HFL ou FFL. Ceci explique l'absence de valeurs de SNR inférieures à 50 comme pour la figure 3.3. Des valeurs de $CRLB$ plus élevées sont cependant observées, correspondant à la quantification de ces résonances sur des spectres où elles ne sont pas, ou peu, visibles. En revanche, pour les données ac-

quises avec une suppression du signal de l'eau, le SNR est évalué à partir de la résonance *Lip13*, dont l'amplitude est la plus élevée lorsque la suppression du signal de l'eau est efficace. Des valeurs de SNR bien plus faibles, correspondant aux spectres acquis pour le sous-groupe FFL, sont obtenues. L'utilisation d'une valeur minimale de SNR égale à 50 semble pouvoir être confirmée ici (CRLB<10%).

Evaluation de la qualité de l'ajustement du modèle sur les données brutes en fonction de la FWHM

Le paramètre FWHM a été mesuré sur la résonance dont l'amplitude est la plus élevée sur le spectre considéré. Dans le cas de cette étude, les résonances ayant la plus forte amplitude ont été : l'eau et la résonance *Lip13* pour les spectres acquis sans et avec suppression du signal de l'eau, respectivement. La suppression du signal de l'eau ayant été moins efficace pour les acquisitions cliniques, seules les données du groupe pré-clinique seront commentées.

L'idéal étant d'avoir une valeur de FWHM la plus basse possible (*i.e.* des résonances les plus fines possibles), le réglage du matériel d'acquisition est donc une étape importante. Cependant, il ne faut pas oublier que la FWHM va aussi dépendre du tissu considéré, du champ magnétique utilisé et des éléments pouvant perturber l'acquisition du signal (mouvements, battements cardiaques, etc...). Lors de notre étude pré-clinique, les acquisitions ont été synchronisées avec la fréquence respiratoire afin d'en minimiser l'effet, et un réglage manuel de la bobine RF a été réalisé.

La figure 3.5 présente l'évolution des valeurs de CRLB des résonances *Lip09* et *Lip21*, relevées sur les spectres du groupe pré-clinique (HFL et FFL), en fonction des valeurs de FWHM. Pour les données obtenues sans suppression du signal de l'eau, aucune tendance d'évolution des valeurs de CRLB en fonction de la FWHM ne semble apparaître. Cependant, dans le cas des données acquises avec suppression du signal de l'eau, les valeurs de CRLB tendent à augmenter avec la FWHM. Ces constats sont confirmés lors de l'observation séparée des données des sous-groupes HFL et FFL. A partir de ces graphiques, il semble raisonnable de conclure qu'une valeur de FWHM comprise entre 40 et 60 Hz est nécessaire, dans nos conditions expérimentales, pour le respect de la condition CRLB<10%.

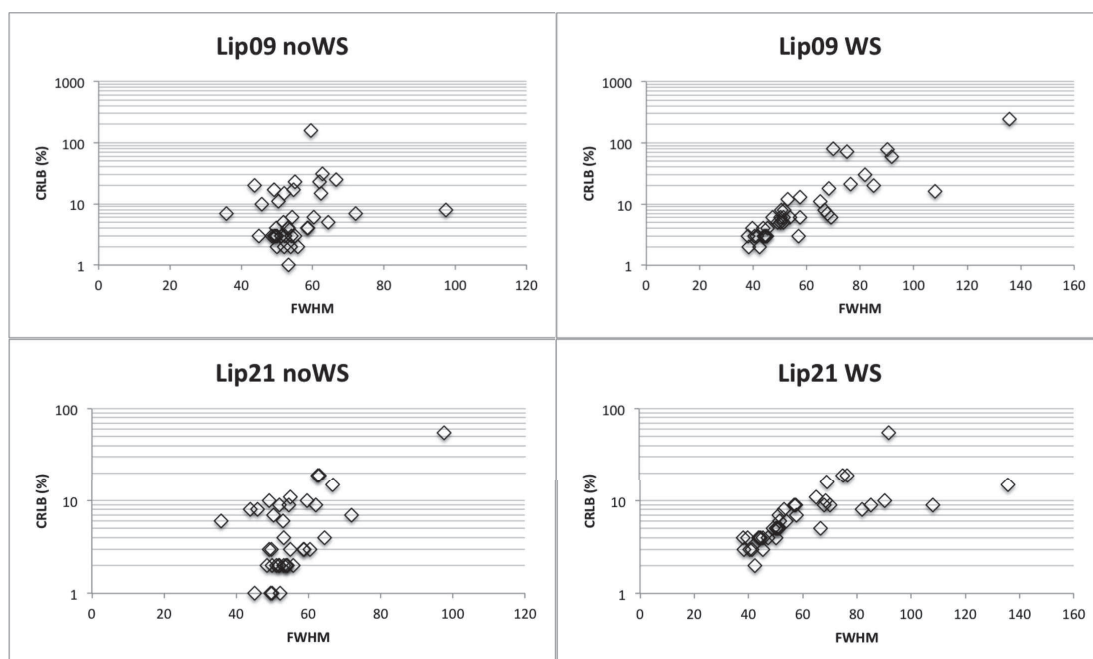


FIGURE 3.5 – Représentations graphiques des valeurs de $CRLB$ en fonction de la $FWHM$ mesurées pour les résonances Lip09 et Lip21 quantifiées sur les spectres acquis sans (*noWS*) ou avec (*WS*) suppression du signal de l'eau, pour les sous-groupes *HFL* et *FFL* pré-cliniques ($n=38$).

Evaluation de la qualité de l'ajustement du modèle sur les données brutes en fonction des valeurs de SNR et de $FWHM$

Les deux paragraphes précédents ont eu pour but d'étudier l'évolution des valeurs de $CRLB$ en fonction du SNR d'un côté, et de la $FWHM$ de l'autre, donnant comme condition de "validité" des données spectrales : $SNR > 50$ et $FWHM \in [40; 60]$ Hz. Bien que d'habitude ces paramètres soient utilisés séparément, il faut noter qu'ils sont liés l'un à l'autre de façon assez évidente. En effet, l'aire sous la courbe d'une résonance est un indicateur de la concentration du métabolite concerné dans le voxel étudié. Lors d'une acquisition dans un même voxel, une augmentation de la $FWHM$ induira une diminution de l'amplitude de cette résonance et donc du SNR, et inversement, de façon à ce que l'aire sous la courbe d'une même résonance reste constante. Le rapport $SNR/FWHM$ a donc été introduit par *Jiru et al.* en 2006, comme critère d'évaluation de la qualité spectrale requise pour la quantification des résonances présentes. Une décroissance exponentielle des valeurs de $CRLB$ est attendue lorsque le rapport $SNR/FWHM$ augmente.

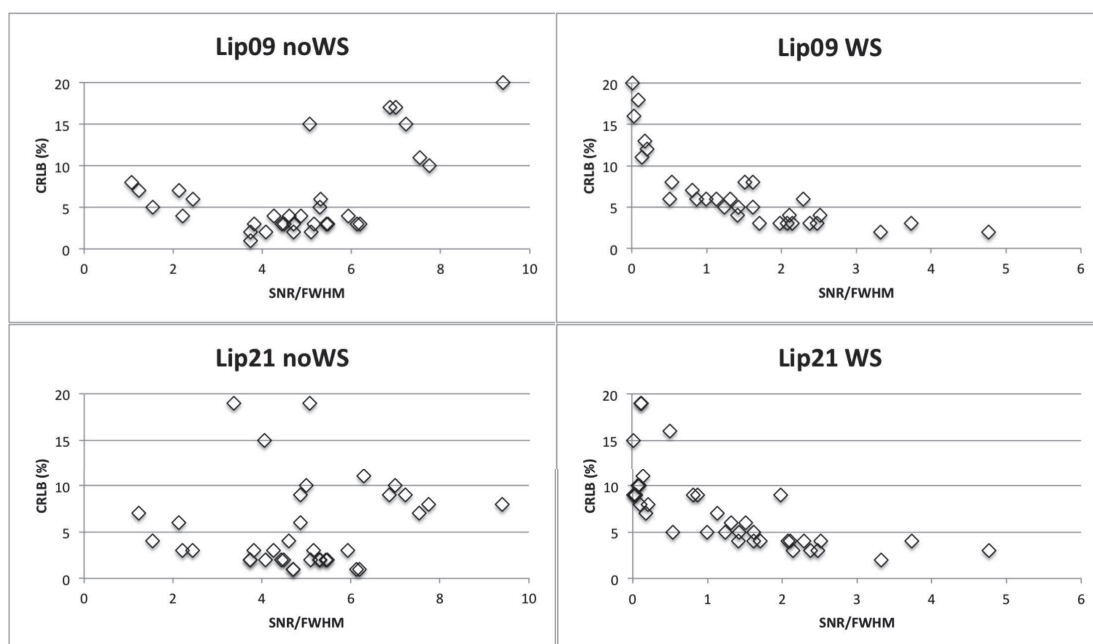


FIGURE 3.6 – Représentations graphiques des valeurs de CRLB en fonction du rapport $SNR/FWHM$ pour les résonances *Lip09* et *Lip21* quantifiées sur les spectres acquis sans (*noWS*) ou avec (*WS*) suppression du signal de l'eau, pour les sous-groupes *HFL* et *FFL* pré-cliniques ($n=38$).

Les graphiques représentant les données acquises avec suppression du signal de l'eau sont en accord avec l'allure attendue pour ce type de données (figure 3.6), alors que la même observation n'est pas évidente pour les données acquises sans suppression du signal de l'eau. Ceci peut s'expliquer par le fait que le SNR et la FWHM sont évalués sur la résonance *Lip13* des lipides, sur les spectres acquis avec suppression du signal de l'eau, rendant ainsi ces paramètres plus comparables avec la quantification des résonances *Lip09* et *Lip21*, elles aussi associées aux lipides, alors que SNR et FWHM sont calculés à partir de la résonance de l'eau, beaucoup plus prononcée que la résonance majeure des lipides, sur les spectres acquis sans suppression. Ceci pourrait expliquer pourquoi, malgré une valeur élevée du rapport $SNR/FWHM$, les valeurs de CRLB de certains points (issus des spectres acquis sur le sous-groupe *FFL*) sont elles aussi élevées. Par cette dernière observation, il semble qu'il soit nécessaire, dans le cas des acquisitions sans suppression du signal de l'eau, de déterminer une valeur du rapport $SNR/FWHM$ minimale pour chaque sous-groupe (*HFL* et *FFL*). En effet, un rapport égal à 1 pour les données *HFL* sans suppression du signal de l'eau paraît suffisant au respect de la règle $CRLB < 10\%$ (pour les résonances *Lip09* et *Lip21*), alors que ce rapport doit s'élever à un minimum de 7 pour la résonance *Lip21*, et à plus de 10 sans doute

(limite de nos données) si la résonance *Lip09* est utilisée lors de l'étude concernée. Pour les données avec suppression du signal de l'eau, une seule valeur de ce rapport peut être définie, à savoir un rapport de 0,5 minimum.

En résumé, le protocole idéal pour l'acquisition de données de SRM dans le foie, dans nos conditions expérimentales est celui permettant l'obtention d'un $\text{SNR} > 50$, d'un $\text{FWHM} \in [40; 60]$ et/ou d'un rapport $\text{SNR}/\text{FWHM} > 1$ (sous-groupe HFL sans suppression du signal de l'eau) ou 0,5 (sous-groupes HFL et FFL avec suppression du signal de l'eau). Ces critères de qualité ont été déterminés à partir de nos données pré-cliniques uniquement, les données cliniques n'étant pas exploitables pour cette analyse. Cependant, nous avons considéré cohérent d'appliquer ces critères également pour nos acquisitions cliniques.

Tous les spectres utilisés pour l'étude présentée tout au long de ce chapitre, et pour la mesure moyenne de la quantification de la composition des lipides hépatiques présentée plus loin dans ce chapitre, respectent ces critères.

3.2.3 Evaluation de la qualité globale de l'ajustement du modèle sur les données brutes

Lors du traitement des données spectrales avec le logiciel *LCModel*, un ajustement des courbes simulées pour les lipides est effectué sur les données brutes. Le résidu, représentant la différence entre le signal brut et l'ajustement, est ainsi produit, et informe sur la quantité d'erreur globale faite lors du recalage des simulations sur le signal réel. Comme pour le paragraphe précédent sur la validation du protocole d'acquisition, cette analyse a été réalisée à partir de nos données pré-cliniques uniquement, dans le but de vérifier la qualité de l'ajustement des courbes simulées pour les lipides par *LCModel* dans un cas idéal. Pour nos données, le cas idéal correspond à un signal de l'eau complètement supprimé de façon à ce que la résonance majeure des lipides (*Lip13*) soit le signal d'amplitude maximale.

Pour l'ensemble des données pré-cliniques, un premier examen visuel a permis d'éliminer les éventuels spectres pour lesquels le modèle utilisé par *LCModel* n'a pu être ajusté sur les données brutes. Pour les autres spectres, un paramètre M a été introduit afin d'évaluer le résidu par rapport au signal ajusté. Pour les spectres acquis sur les animaux du sous-groupe HFL pré-clinique, la déviation standard (*Std*) du résidu, entre 0 et 3,5 ppm, a été calculée, et l'amplitude de la résonance

Lip13 a été mesurée. Le paramètre M a ensuite été défini comme suit :

$$M = 100. \frac{Std}{AmpMax} \quad (3.3)$$

Le choix de la fenêtre d'analyse du spectre, de 0 à 3,5 ppm, est pertinent pour une étude de la quantification des résonances lipidiques étant donné que toutes les résonances d'intérêt (à l'exception de la résonance *Lip53+52*) y sont présentes. De plus, cela permet de ne pas biaiser l'étude par la quantification de la résonance de l'eau résiduelle. En effet, sur certains spectres acquis avec suppression du signal de l'eau, la contribution majeure au résidu est celle provenant de la résonance de l'eau résiduelle. Ceci est compréhensible étant donné que cette résonance est partiellement supprimée, et donc "endommagée" par le module de suppression du signal de l'eau et peut ne plus correspondre au modèle de recalage simulé à partir de gaussiennes et lorentziennes. Enfin, le fait de prendre la résonance *Lip13* comme référence pour l'amplitude utilisée pour le paramètre M permet d'effectuer la même analyse sur les spectres acquis sans et avec suppression du signal de l'eau.

Les valeurs de M obtenues pour le sous-groupe HFL pré-clinique sont égales à $0,583 \pm 0,051\%$ et $0,665 \pm 0,053\%$, sans et avec suppression du signal de l'eau, respectivement. La déviation standard du résidu, entre 0 et 3,5 ppm, étant inférieure à 1% du signal ajusté, la quantification peut être considérée comme réussie, de manière globale, pour les spectres acquis sans et avec suppression du signal de l'eau pour le sous-groupe HFL pré-clinique.

D'autre part, la valeur moyenne du paramètre M est plus élevée dans le cas des acquisitions effectuées avec suppression du signal de l'eau. Afin de valider que cette différence observée soit statistiquement significative, un test de Student a été réalisé, comparant les valeurs du paramètre M calculées sans et avec suppression du signal de l'eau (sous-groupe HFL pré-clinique ; $n=25$). La valeur du risque p obtenue a été de 0,0043, indiquant une différence statistiquement significative entre la valeurs de M mesurées sans et avec suppression du signal de l'eau. L'ajustement des résonances associées aux lipides, entre 0 et 3,5 ppm, est donc plus précis pour les spectres acquis sans suppression du signal de l'eau.

La même étude n'a pas été réalisée pour le sous-groupes FFL pré-clinique. La question qui peut se poser concerne le fait d'utiliser la même gamme que précédemment (à savoir entre 0 et 3,5 ppm) ou d'en choisir une plus restreinte autour de la résonance *Lip13*. En effet, dans le cas de ce sous-groupe, la seule résonance res-

pectant le critère $CRLB < 10\%$ est la résonance majeure des lipides à savoir *Lip13*. Une fenêtre d'observation restreinte autour de cette résonance semble alors appropriée pour l'évaluation de la qualité globale de l'ajustement du signal simulé sur le signal réel. Or, par exemple, la résonance *Lip16*, pour laquelle l'ajustement n'est pas acceptable, est proche de la résonance *Lip13* et présente une zone de recouvrement avec cette dernière. La déviation standard du résidu calculée, même sur cette fenêtre, sera donc biaisée par la contribution majeure de la résonance *Lip16*. D'autre part, le fait de limiter la fenêtre d'analyse aurait pour effet de tronquer une partie de la résonance *Lip13* dont les limites s'étendent jusqu'à celles de la résonance *Lip21*. Le paramètre M proposé est, dans ce cas, sensible au choix de la fenêtre d'analyse. Pour cette raison, et étant donné qu'aucune étude similaire n'a été proposée dans la littérature, il n'est pas évident de choisir les paramètres pour l'analyse du résidu afin de valider la quantification d'une résonance particulière lorsque d'autres résonances non quantifiées recouvrent le signal de cette dernière.

Cette étude préliminaire a permis d'envisager une étude approfondie de la quantification des résonances lipidiques, dans nos conditions expérimentales, par l'analyse des valeurs de CRLB propres à la quantification de chaque résonance dans le cas du sous-groupe HFL pré-clinique. De plus, les premiers résultats issus des tests statistiques de Student soulignent un meilleur ajustement global du spectre lors de nos acquisitions sans suppression du signal de l'eau.

Aucune conclusion de ce type n'a pu être observée pour le sous-groupe FFL pré-clinique. Pour la totalité des données cliniques, cette analyse n'a pu être réalisée compte tenu des conditions d'acquisition ne permettant pas l'optimisation du module de suppression du signal de l'eau. Cependant aucun résultat n'a pu être considéré comme un argument empêchant la suite de l'étude visant à évaluer l'effet de la suppression du signal de l'eau sur la quantification des résonances lipidiques, par *LCModel*, pour ces données.

3.3 Evaluation de l'effet de la suppression du signal de l'eau de l'eau

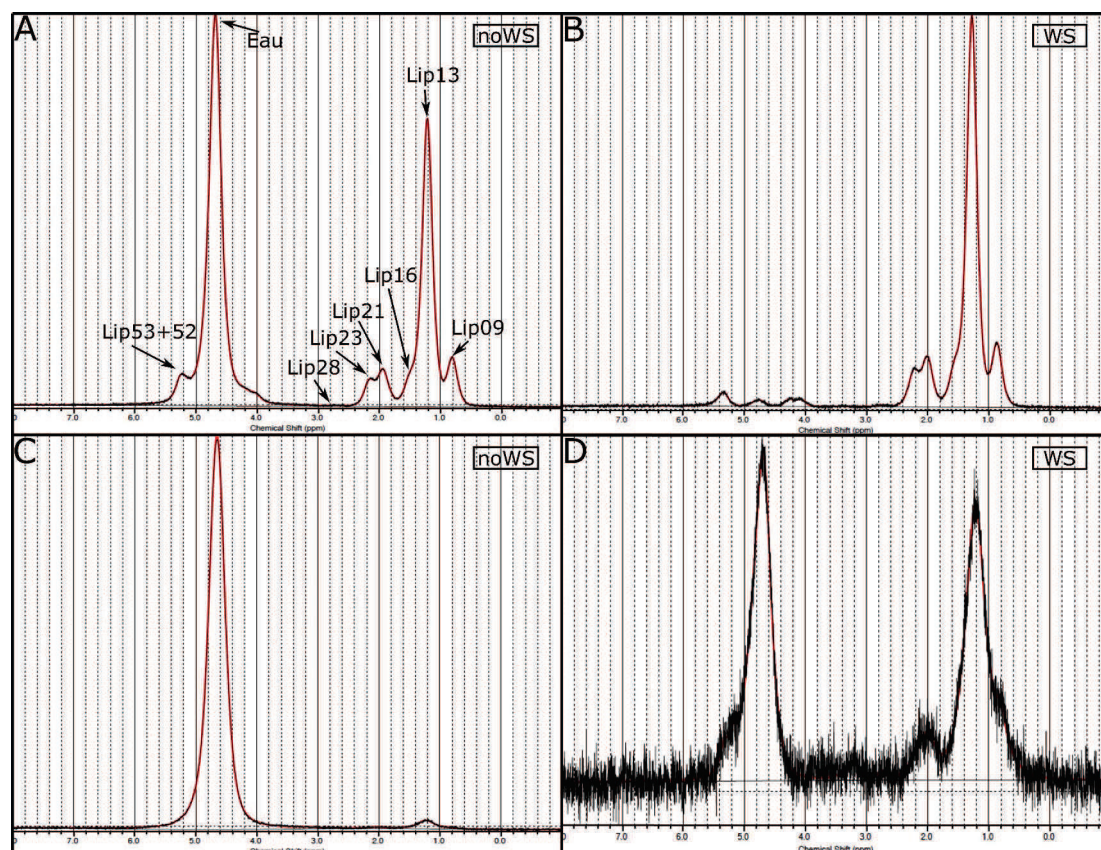


FIGURE 3.7 – Spectres de SRM acquis sans (*noWS*) et avec (*WS*) suppression du signal de l'eau, dans le foie d'une souris présentant une haute fraction lipidique (HFL; FL = 36,5%) (A, B) et dans le foie d'une souris présentant une faible fraction lipidique (FFL; FL = 2,0%). Chaque résonance lipidique d'intérêt est indiquée par une flèche sur le spectre sans suppression du signal de l'eau (*noWS*; A) acquis sur la souris du groupe HFL. La suppression du signal de l'eau, effectuée par le module VAPOR, a été efficace chez les deux souris (spectres *WS*; B et D)

Des exemples de spectres acquis sans et avec suppression du signal de l'eau (*noWS* et *WS*, respectivement) dans le foie d'une souris sujette à une infiltration lipidique hépatique sévère (HFL; figure 3.7, A et B, respectivement), et dans le foie d'une souris présentant une faible fraction lipidique (FFL; figure 3.7, C et D, respectivement), sont présentés à la figure 3.7. Chaque résonance associée au spectre des lipides est indiquée par une flèche, et sa nomenclature utilisée par le logiciel *LCModel*, sur le spectre dont l'eau n'est pas supprimée chez la souris du groupe HFL (figure 3.7, A). Une qualité spectrale similaire est observée entre les

deux spectres acquis sur la souris du sous-groupe HFL (figure 3.7, A et B). Sur les deux spectres acquis sur la souris du sous-groupe FFL (figure 3.7, C et D), la seule résonance des lipides au-dessus du niveau de bruit est la résonance majeure des lipides (*Lip13*). Une excellente suppression du signal de l'eau, réalisée avec le module VAPOR dont les gains des impulsions ont été ajustés manuellement, a été obtenue (figure 3.7, B et D).

3.3.1 La valeur de CRLB, paramètre de la qualité de la quantification

Pour chaque spectre, seuls les résultats concernant les résonances pour lesquelles le logiciel *LCModel* a calculé un paramètre $CRLB < 10\%$ ont été conservés pour l'étude. Au dessus de ce seuil, la précision de la quantification de la résonance par le logiciel *LCModel* est considérée comme insuffisante pour l'exploitation des données qui en sont issues.

Dans le sous-groupe HFL pré-clinique, en raison de la forte présence de lipides, une excellente quantification de la résonance lipidique majeure (*Lip13*) a été observée, avec des valeurs de CRLB comprises entre 1 et 2%. D'autre part, les valeurs de CRLB de cette résonance n'ont pas été améliorées (*i.e.* réduites) pour les spectres acquis avec suppression du signal de l'eau. Concernant les autres résonances associées aux lipides, présentant une plus faible amplitude sur les spectres, une bonne quantification a été observée, ceci grâce à la haute fraction lipidique. Par exemple, les valeurs des CRLB relevées pour la résonance *Lip21* (à 2,02 ppm), importante pour différencier les acides gras saturés et insaturés (AGS et AGI, respectivement), sont présentées dans le tableau 3.1. Un effet de la suppression du signal de l'eau sur les valeurs de CRLB est clairement observable, avec une augmentation générale de ces valeurs dans les spectres acquis avec suppression du signal de l'eau (augmentation allant de 14% à 80% pour vingt-et-un des vingt-cinq spectres). Pour les cas restants, les valeurs de CRLB diminuent peu, ou ne changent pas, avec l'utilisation de la suppression du signal de l'eau.

Spectre	CRLB(%) noWS	CRLB(%) WS	Δ CRLB(%)	FL(%)
1	5	2	-150	19,9
2	6	4	-50	24,5
3	2	2	0	32,3
4	3	3	0	26,4
5	6	7	+14	17,6
6	3	4	+25	29,8
7	3	4	+25	19,7
8	3	4	+25	21,7
9	3	4	+25	25,5
10	2	3	+33	26,5
11	4	7	+43	26,4
12	3	6	+50	28,2
13	2	4	+50	30,3
14	2	4	+50	30,1
15	2	4	+50	30,9
16	7	16	+56	29,8
17	4	9	+56	30,3
18	2	5	+60	15,0
19	2	6	+67	34,8
20	1	3	+67	25,1
21	1	3	+67	36,5
22	2	9	+78	27,2
23	2	9	+78	36,1
24	1	5	+80	22,0
25	1	5	+80	35,5

TABLEAU 3.1 – Valeurs des bornes de Cramér-Rao (CRLB) de la résonance Lip21 (à 2,02 ppm). Les spectres ($n=25$) ont été acquis sans (noWS) et avec (WS) suppression du signal de l'eau sur des souris du sous-groupe HFF ($FL \geq 15\%$). De manière générale, une augmentation des valeurs de CRLB de cette résonance est observée pour les spectres acquis avec la suppression du signal de l'eau. Le pourcentage de différence entre la valeur de CRLB obtenue avec ou sans suppression du signal de l'eau a été calculé de la façon suivante : $\Delta CRLB = 100 * [CRLB_{WS} - CRLB_{noWS}] / CRLB_{WS}$. La dernière colonne donne la fraction lipidique mesurée sur chacun des spectres.

Dans le sous-groupe FFL pré-clinique ($n=13$), les changements de valeurs de CRLB de la résonance Lip13 ne présentent pas de tendance particulière (tableau 3.2). Dans 50% des cas, une dégradation de la quantification (*i.e.* une valeur plus élevée de CRLB) a été observée avec suppression du signal de l'eau, alors que l'inverse a été observé dans l'autre moitié des cas. La résonance Lip21 n'a pu être quantifiée de manière fiable ($CRLB > 10\%$) à cause de la faible fraction en lipides présente.

Spectre	CRLB(%) noWS	CRLB(%) WS	Δ CRLB(%)	FL(%)
1	20	5	-300	0,5
2	7	3	-133	2,0
3	4	3	-33	1,7
4	5	4	-25	1,4
5	4	4	0	1,9
6	5	5	0	0,8
7	3	3	0	1,5
8	2	3	+33	2,2
9	6	9	+33	1,4
10	3	6	+50	1,6
11	2	4	+50	1,9
12	3	10	+70	1,5
13	4	13	+70	2,0

TABLEAU 3.2 – Valeurs des bornes de Cramér-Rao (CRLB) de la résonance *Lip13* obtenue sur des spectres ($n=13$) acquis sans (noWS) ou avec (WS) suppression du signal de l'eau sur des souris du sous-groupe FFL ($FL < 15\%$)

Une analyse similaire de l'effet de la suppression du signal de l'eau sur la quantification des résonances lipidiques a été réalisée sur les données cliniques de l'étude. Dans le sous-groupe HFL clinique ($n=5$), une excellente quantification de la résonance lipidique majeure (*Lip13*) a été obtenue avec et sans suppression du signal de l'eau, les valeurs de CRLB allant de 1% à 2% (à l'exception d'un cas dont la valeur de CRLB était de 9%). Dans trois cas, aucun changement n'a été observé avec suppression du signal de l'eau. Dans deux cas, les valeurs de CRLB étaient diminuées avec la suppression du signal de l'eau (de 2% à 1%, et de 9% à 4%). En ce qui concerne la résonance *Lip21*, elle a pu être quantifiée ($CRLB < 10\%$) sur les spectres avec et sans suppression du signal de l'eau de quatre des cinq patients de ce sous-groupe. Les valeurs des CRLB de 2 à 6% et 2 à 10% pour les spectres acquis avec et sans suppression du signal de l'eau, respectivement.

Dans le sous-groupe FFL clinique ($n=6$), seule la résonance *Lip13* a pu être quantifiée de manière fiable avec et sans suppression du signal de l'eau avec des valeurs de CRLB allant de 1 à 4% et 2 à 5%, respectivement. Globalement, la suppression du signal de l'eau a eu un effet négligeable sur la quantification de cette résonance avec une diminution maximale de 2% de la valeur de CRLB avec suppression du signal de l'eau dans un cas unique.

En résumé, l'analyse des valeurs de CRLB indique que le fait d'utiliser la suppres-

sion du signal de l'eau lors d'acquisitions de SRM n'implique aucune amélioration, voire une dégradation, des données spectrales.

Enfin, pour évaluer l'effet de la suppression du signal de l'eau sur la quantification des résonances des lipides, un test de Student a été utilisé pour la comparaison entre les valeurs de CRLB obtenues pour chaque résonance lipidique sans et avec suppression du signal de l'eau, le niveau de confiance étant fixé à 95%.

	HFL		FFL	
	n = 25		n = 13	
	WS	noWS	WS	noWS
<i>Lip09</i>		0,0022**		0,3094
<i>Lip13</i>		0,0042**		0,8499
<i>Lip16</i>		0,0392*		
<i>Lip21</i>		0,0002**		
<i>Lip23</i>		0,0116*		
<i>Lip53+52</i>	0,0026**			

TABLEAU 3.3 – Valeurs de risque p obtenues par le test de Student entre les valeurs CRLB de chaque résonance lipidique issues de spectres acquis sans (noWS) ou avec (WS) suppression du signal de l'eau. Les spectres ont été acquis sur les souris dont la fraction lipidique est élevée (HFL, $FL \geq 15\%$) et dont la fraction lipidique est faible (FFL, $FL < 15\%$). Les valeurs de CRLB sont inférieures sans suppression du signal de l'eau, à l'exception de la résonance Lip53+52. (**) $p < 0,01$; (*) $p < 0,05$.

Pour les données pré-cliniques (tableau 3.3), dans le sous-groupe HFL, le test de Student a mis en avant une forte corrélation entre la stratégie d'acquérir les spectres de SRM avec une suppression du signal de l'eau, et la dégradation de la quantification des résonances lipidiques (plage de valeurs de p : 0,0002-0,0392), à l'exception de la résonance *Lip53+52* ($p = 0,0026$). Dans le cas du sous-groupe FFL, il n'a pas été observé de différence statistiquement significative entre la qualité de quantification des résonances associées aux lipides obtenues à partir de spectres acquis avec ou sans suppression du signal de l'eau (p vaut 0,30 et 0,85 pour les résonances *Lip09* et *Lip13*, respectivement).

Pour le sous-groupe HFL clinique, le test de Student n'a pas permis de mettre en avant une différence statistiquement significative entre la quantification de la résonance *Lip13* réalisée sur les spectres acquis avec ou sans suppression du signal de l'eau ($p = 0,14$). Cette même observation est applicable à la résonance *Lip21*

($p = 0,27$). En revanche, pour le sous-groupe FFL clinique, le test de Student a montré une corrélation ($p = 0,006$) entre l'acquisition des spectres avec suppression du signal de l'eau, et une amélioration de la quantification de la résonance *Lip13* (la seule dont la quantification est suffisamment fiable). Cependant, comme les valeurs des CRLB sont semblables pour les deux méthodes d'acquisition, il est possible de considérer cette amélioration négligeable.

En résumé, l'analyse statistique des résultats montre que le fait d'appliquer une suppression du signal de l'eau lors de l'acquisition de spectres de SRM, dans le foie, dans nos conditions expérimentales, provoque une détérioration des données spectrales ou, dans le meilleur des cas, aucune amélioration.

3.3.2 Evaluation de l'impact de la suppression du signal de l'eau au voisinage de la résonance de l'eau

Un nouveau paramètre R a été introduit dans cette étude dans le but d'évaluer l'impact de la suppression du signal de l'eau sur la résonance *Lip53+52*, qui est très proche de celle de l'eau. Le paramètre R est défini comme le rapport de l'aire sous la courbe de la résonance *Lip13* sur celle de la résonance *Lip53+52*, soit :

$$R = \frac{[Lip13]}{[Lip53 + 52]} \quad (3.4)$$

Ce paramètre a donc été calculé pour chaque souris et patient sur les spectres acquis sans et avec suppression du signal de l'eau, puis comparés deux à deux. Dans le cas idéal, la valeur de R ne devrait pas être différente sans et avec suppression du signal de l'eau. Une augmentation du paramètre R pour les spectres acquis avec suppression du signal de l'eau indique une réduction du signal de la résonance *Lip53+52* probablement en raison des impulsions RF du module de suppression du signal de l'eau. Ici encore, la valeur de R n'a été calculée que pour les spectres dont la quantification de la résonance *Lip53+52* présentait une $CRLB < 10\%$, avec ou sans suppression du signal de l'eau.

A chaque fois, la valeur de R calculée a été supérieure pour le spectre acquis avec suppression du signal de l'eau, ceci est présenté sur la figure 3.8 pour le groupe pré-clinique. Des résultats similaires ont été obtenus pour le groupe clinique.

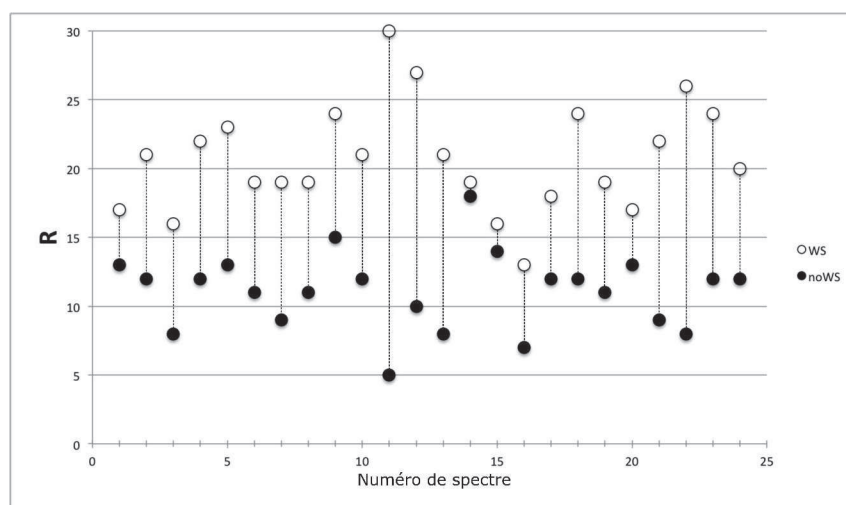


FIGURE 3.8 – Représentation graphique du rapport R ($R = [Lip13]/[Lip53+52]$) calculé sur les spectres acquis sur les souris du sous-groupe HFL ($FL \geq 15\%$) avec (WS) ou sans (noWS) suppression du signal de l'eau. Ce paramètre n'a été calculé que pour les spectres présentant une $CRLB < 10\%$ pour la résonance Lip53+52 ($n=24$). Les lignes en pointillés ont été tracées pour aider à la comparaison visuelle.

3.3.3 Quantification de la composition des lipides hépatiques

La quantification de la composition des lipides hépatiques a été effectuée en utilisant l'algorithme de *Corbin et al.* [20] exposé dans le chapitre 4 (§4.1.4 page 96). Cet algorithme de quantification de la composition en AG des lipides a été choisi puisque publié dans un contexte expérimental proche de notre étude pré-clinique (étude *in vivo* sur modèle murin à 4,7 T). Actuellement, aucune étude clinique de quantification complète de la composition en AG des lipides hépatiques n'a été publiée. Les résonances nécessaires à l'application de l'algorithme de *Corbin et al.* (*Lip21*, *Lip23* et *Lip28*) n'étant pas suffisamment bien quantifiées sur les spectres acquis pour les sous-groupes LFF pré-clinique et clinique, la composition en AG des lipides hépatiques a été évaluée uniquement pour les sous-groupes HFF pré-clinique et clinique, avec et sans suppression du signal de l'eau. D'autre part, la résonance *Lip28* n'ayant pas une amplitude suffisante pour une quantification répondant au critère $CRLB < 10\%$, il a été impossible de faire la différenciation entre les acides gras mono-insaturés (AGMI) et poly-insaturés (AGPI). La composition en acides gras des lipides hépatiques est donc composée de deux éléments, les acides gras saturés (AGS) et les acides gras insaturés (AGI).

Les valeurs moyennes de la composition lipidiques dans le foie des souris et des patients de cette étude sont :

- pour le sous-groupe HFL pré-clinique ($n=25$) :

- AGS = 29,23% et AGI = 70,77% ($\pm 4,62\%$) sans suppression du signal de l'eau ;
- AGS = 30,88% et AGI = 69,12% ($\pm 5,29\%$) avec suppression du signal de l'eau ;
- pour le sous-groupe HFL clinique (n=5) :
 - AGS = 43,25% et AGI = 56,75% ($\pm 6,08\%$) sans suppression du signal de l'eau ;
 - AGS = 39,65% et AGI = 60,35% ($\pm 5,60\%$) avec suppression du signal de l'eau.

Il apparaît donc que l'utilisation ou non de la suppression du signal de l'eau ne semble pas avoir d'impact sur la quantification de la composition des lipides hépatiques.

3.4 Discussion

Dans ce chapitre, une évaluation quantitative de l'impact de la suppression du signal de l'eau sur la quantification des lipides hépatiques a été présentée. A ce jour, que ce soit pour des études pré-cliniques ou cliniques, il n'existe pas de méthode de référence pour l'acquisition de spectres par SRM dans le foie. L'analyse de la littérature montre en particulier que, pour des applications *in vivo* visant à déterminer la fraction lipidique ainsi que la composition en AG des lipides hépatiques, le protocole expérimental inclut, dans certains cas, deux spectres (l'un sans et l'autre avec suppression du signal de l'eau) [3, 15, 20, 26, 69–73] quand un seul spectre sans suppression du signal de l'eau est acquis dans d'autres cas [2, 4, 10, 11, 18, 67, 68]. Des études antérieures ont utilisé des spectres sans suppression du signal de l'eau pour évaluer le contenu lipidique hépatique chez des patients, en comparaison avec des analyses histologiques et biochimiques de biopsies prélevées sur ces mêmes patients [80, 81], validant l'utilisation de la SRM du proton sans suppression du signal de l'eau pour déterminer la fraction lipidique hépatique (la composition du contenu lipidique hépatique n'étant pas étudiée dans ces travaux). Dans notre étude, des spectres de SRM ont été acquis avec et sans suppression du signal de l'eau sur des patients, à 3,0 T, et sur des souris, à 4,7 T. Pour chaque résonance associée aux lipides, la valeur de CRLB, calculée par le logiciel *LCModel*, a été utilisée comme un paramètre afin de déterminer l'effet de la suppression du signal de l'eau sur la quantification des lipides hépatiques. Ainsi, les valeurs des CRLB obtenues à partir des spectres acquis avec suppression du signal de l'eau ont été comparées

aux valeurs correspondantes issues des spectres acquis sans suppression du signal de l'eau. De cette façon, il a été mis en évidence que l'acquisition de spectres avec suppression du signal de l'eau ne présente pas d'avantage puisque cela n'implique pas d'amélioration de la quantification des résonances des lipides hépatiques. De plus, il est fort probable que la suppression du signal de l'eau induise une dégradation des résonances proches de celle de l'eau. Les résultats de notre étude indiquent donc que, dans nos conditions expérimentales, il est possible d'écourter le protocole expérimental sans pour autant perdre de l'information, ceci en ne faisant l'acquisition que d'un seul spectre, sans suppression du signal de l'eau.

Il est important de noter que les conditions expérimentales de cette étude, en particulier l'amplitude du champ magnétique, sont similaires à celles d'études précédentes effectuées sur des installations cliniques, où les systèmes d'IRM à 3,0 T deviennent de plus en plus communs [10], et dans le cadre d'expérimentations pré-cliniques. Il est intéressant de souligner que de nombreux travaux réalisés sur le foie de souris et de rat ont été effectués en utilisant des amplitudes de champ magnétique modérées [20, 67, 70, 82], ce qui est en nette opposition avec les études de SRM du cerveau qui sont majoritairement effectuées, en pré-clinique, à des champs magnétiques élevés ($\geq 7,0$ T) [26]. Les résultats de notre étude sont donc pertinents et présentent un intérêt pour la communauté scientifique travaillant en SRM *in vivo* sur le foie dans un contexte pré-clinique ou clinique.

Concernant l'analyse de spectres de lipides hépatiques acquis *in vivo*, différents logiciels et modèles sont utilisés sans méthode bien établie. Ceci est notamment dû au fait que le profil précis des résonances associées aux lipides n'est pas connue *a priori*. Du fait de la complexité de la structure et de la taille importante, des molécules de triglycérides, les simulations de mécanique quantique basées sur la matrice de densité ne peuvent complètement modéliser le profil des résonances des lipides. En conséquence, les méthodes de recalage utilisées pour modéliser ces résonances utilisent des approches empiriques. En particulier, le logiciel utilisé dans cette étude (*LCModel*) emploie une combinaison de courbes gaussiennes et lorentziennes pour chaque résonance lipidique, dans le but de déterminer l'aire sous la courbe de chacune d'entre elles. Il faut noter que la procédure d'analyse des données de SRM acquises sur un organe autre que le foie, et considérant d'autres métabolites que les lipides, est différente. Par exemple, en SRM du cerveau et de la prostate, il est possible de modéliser séparément et avec un haut niveau de précision, en utilisant des simulations de mécanique quantique, les formes des courbes associées à chaque métabolite (glutamate, myoinositol, citrate, etc...), et il est

donc possible d'utiliser ces connaissances *a priori* pour l'ajustement des données. Une limite de notre étude est que, pour évaluer l'effet de la suppression du signal de l'eau sur la quantification des résonances associées aux lipides hépatiques, le seul paramètre utilisé est la valeur de la CRLB. Les limitations de ces valeurs de CRLB, connues et décrites dans la littérature [83,84], peuvent avoir un impact sur l'évaluation de la quantification des résonances lipidiques lorsque l'on considère un spectre avec une faible fraction lipidique. Cependant, il n'existe pas de paramètre de référence pour valider les résultats obtenus par la CRLB pour la résonance spécifique *Lip13* quantifiée dans le cas d'une faible fraction lipidique ; d'autres études seraient nécessaires afin de définir un paramètre spécifique et adapté pour ce type d'analyse.

Un autre élément important est l'existence de différents modules de suppression du signal de l'eau. Généralement, le module de suppression du signal de l'eau utilisé sur les spectromètres imageurs cliniques est composé de deux à quatre impulsions CHESS tandis que des méthodes plus sophistiquées sont disponibles sur les spectromètres imageurs pré-cliniques. Au cours de cette étude, les modules de suppression du signal de l'eau utilisés ont été, VAPOR pour la partie pré-clinique, et WET pour la partie clinique, composés de sept et trois impulsions CHESS, respectivement. Pour les données spectroscopiques acquises sur le spectromètre imageur clinique, aucun ajustement manuel de la suppression du signal de l'eau n'a pu être effectué, entraînant une suppression incomplète du signal de l'eau sur certains spectres. Au contraire, l'utilisation du module de suppression VAPOR et d'un ajustement manuel des gains de ces impulsions, au cours des acquisitions pré-cliniques, ont permis une excellente suppression du signal de l'eau sur l'intégralité des spectres. Il paraît important d'ajouter que, au cours de la plupart des études cliniques, en raison de contraintes de temps, l'ajustement manuel de la suppression du signal de l'eau (lorsqu'il est disponible) est rarement utilisé.

Ces différents modules de suppression du signal de l'eau ayant une précision variable s'agissant de la fenêtre spectrale de suppression du signal autour de la résonance de l'eau, une évaluation de leur impact sur les résonances voisines est nécessaire. Dans l'étude présentée, l'utilisation du paramètre R (*cf* §3.3.2 page 81), a mis en évidence un effet systématique sur la quantification de la résonance *Lip53+52* évaluée sur les spectres acquis sans et avec suppression du signal de l'eau sur les souris. La valeur de R était plus faible avec suppression du signal de l'eau que celle calculée sur le spectre correspondant sans suppression du signal de l'eau. Lors de la spectroscopie *in vivo* du foie, il est établi que le mouvement

provoqué par la respiration et le battement cardiaque a un effet néfaste sur la fréquence de résonance, impliquant potentiellement une suppression partielle des résonances proches de celle de l'eau, par le module de suppression du signal de l'eau. Cependant, n'ayant pas de valeur servant de référence pour la résonance *Lip53+52* dans cette étude, il est impossible de conclure que l'effet systématique soit dû au spectre acquis sans ou avec suppression du signal de l'eau. Comme il a été présenté précédemment dans ce travail, il n'existe pas, dans la littérature actuelle, de méthode établie d'acquisition des données SRM pour la quantification des lipides hépatiques (avec ou sans suppression du signal de l'eau), dans des conditions pré-cliniques à des champs magnétiques similaires à ceux utilisés ici (3,0 T et 4,7 T). Certaines études proposent l'acquisition d'un spectre avec suppression du signal de l'eau, mais n'utilisent pas la résonance *Lip53+52* pour les calculs de quantification étant donné la possible détérioration de cette résonance par la suppression du signal de l'eau [70] ; d'autres études ne font l'acquisition que d'un spectre sans suppression du signal de l'eau [67, 68, 71–73]. Ainsi, d'après les résultats de notre étude, il n'est pas possible de déterminer quelle approche serait la plus bénéfique pour la quantification de la résonance *Lip53+52* à 4,7 T.

En général, les études cliniques portant sur les pathologies hépatiques utilisent la fraction lipidique comme biomarqueur. Par exemple, le diagnostic de la stéatose est basé sur une fraction lipidique atteignant une valeur limite de 5%. Ce biomarqueur peut être déterminé en utilisant les signaux de l'eau et de la résonance majeure associée aux lipides (*Lip13*). Il est donc possible de l'évaluer de manière précise par SRM du proton sans suppression du signal de l'eau [82, 85]. Dans ce cas, l'utilisation de la suppression du signal de l'eau ne ferait qu'ajouter un temps d'acquisition considérable, sans apporter d'information utile. En revanche, malgré le gain d'information que pourrait apporter la quantification de la composition des lipides hépatiques au sujet du métabolisme lipidique hépatique, cette dernière n'est que rarement mesurée. Intuitivement, il semble naturel d'utiliser la suppression du signal de l'eau, comme cela est réalisé en SRM du cerveau, dans le but d'améliorer la détection des faibles résonances associées aux lipides. Cependant, les résultats de l'étude présentée montrent qu'aucune amélioration de la quantification des résonances lipidiques n'est apportée par l'utilisation de la suppression du signal de l'eau ; ceci s'applique à la quantification de la fraction lipidique et de la composition lipidique hépatique. D'où, le protocole clinique peut être considérablement raccourci en n'acquérant qu'un unique spectre sans suppression du signal de l'eau. Cette conclusion est propre au tissu hépatique et ne peut être généralisée à tous les

autres tissus sans vérification, puisque les proportions présentes d'eau et de lipides ne sont pas les mêmes.

3.5 Conclusion

Les résultats présentés dans ce chapitre mettent en évidence que le recours systématique à la suppression du signal de l'eau pour des études en SRM *in vivo* est contestable. Nos résultats, obtenus sur des données pré-cliniques (4,7 T) et cliniques (3,0 T), montrent que, dans nos conditions expérimentales, la suppression du signal de l'eau n'apporte aucune amélioration aux données spectrales, pour la quantification de la fraction lipidique et de la composition des lipides hépatiques. De plus, l'hypothèse d'un effet délétère des impulsions du module de suppression du signal de l'eau, sur les résonances proches de celle de l'eau (ici *Lip53+52*), n'a pu être écartée. De fait, les protocoles pré-cliniques et cliniques peuvent être considérablement raccourcis, sans perte d'information, en n'acquérant qu'un unique spectre de SRM, sans utilisation d'un module de suppression du signal de l'eau. Suite à nos résultats, il apparaît important qu'avant toute étude de SRM *in vivo*, ce type d'analyse soit effectuée afin de déterminer, dans les conditions expérimentales de l'étude envisagée, si le recours à la suppression du signal de l'eau présente un intérêt.

Chapitre 4

Algorithmes de quantification des lipides

Sommaire

4.1	Etat de l'art	91
4.1.1	Algorithme de <i>Zancanaro et al.</i>	92
4.1.2	Algorithme de <i>Yeung et al.</i>	93
4.1.3	Algorithmes de <i>Strobel et al.</i> et de <i>Ren et al.</i>	95
4.1.4	Algorithme de <i>Corbin et al.</i>	96
4.1.5	Corrections en T_1 et/ou T_2	97
4.2	Validation des algorithmes sur objets-tests	98
4.2.1	Validation sur différentes huiles alimentaires	98
4.2.2	Validation sur des émulsions avec différentes fractions lipidiques	109
4.3	Validation <i>in vivo</i> des algorithmes pour la quantification des lipides hépatiques	113
4.3.1	Etude pré-clinique sur modèles murins	113
4.3.2	Etude clinique	118
4.4	Validation <i>in vivo</i> des algorithmes pour la quantification des lipides mammaires	122
4.4.1	Patientes	123
4.4.2	Protocole d'acquisition	123
4.4.3	Résultats	124
4.4.4	Discussion	125
4.5	Conclusion	127

L'intérêt grandissant pour les lipides, biomarqueurs métaboliques au niveau hépatique et potentiels biomarqueurs au niveau mammaire, a motivé de nombreux travaux de recherche de méthodes pour leur quantification. De manière générale, les études s'intéressent à la fraction lipidique qui est relativement facile à mesurer *in vivo* par des méthodes d'IRM, et de SRM. Des travaux de comparaison des valeurs de FL obtenues par IRM, avec l'utilisation des méthodes DIXON [52, 53] ou IDEAL [54–56], et par SRM, ont mis en évidence une forte corrélation des résultats obtenus en utilisant ces deux types d'acquisitions [72, 86, 87]. De plus, il a été soulevé le fait que les techniques d'imagerie ont l'avantage de couvrir une plus grande zone spatiale, et que la SRM permet une mesure de la FL pour des cas où la présence de lipides est très faible [86]. Cependant, la FL est un marqueur de l'évolution de l'infiltration lipidique, mais ne donne que très peu d'information concernant le métabolisme lipidique, par exemple. D'autant plus que la FL ne donne que peu d'intérêt lors de l'étude de tissu mammaire, présentant le plus souvent une FL proche de 100%. Il semble alors intéressant de chercher à quantifier la composition en acides gras (AG) des lipides présents dans le tissu d'intérêt. Ce chapitre a pour but de présenter les différents algorithmes de quantification de ces AG, à partir d'acquisitions de SRM, définis dans la littérature, puis de présenter les résultats des expériences de validation sur des objets-tests (huiles pures, émulsions huile/eau) et *in vivo* (pré-clinique et clinique). Les valeurs de T_1 et T_2 des différentes résonances associées aux lipides ont été déterminées lors des expérimentations sur les objets-tests d'huiles pures. La nécessité d'une correction en T_1 et/ou T_2 a ainsi pu être évaluée et testée.

4.1 Etat de l'art

La quantification de la composition en acides gras des lipides présents dans le volume d'intérêt est réalisée à partir de l'intégration de l'aire sous la courbe des résonances d'intérêt. En effet, cette aire sous la courbe est associée à la concentration du métabolite, ou dans notre cas du groupement chimique de la molécule d'acide gras, correspondant à la résonance dans le voxel étudié (*cf* chapitre 2 paragraphe 2.4.2). C'est en effectuant des rapports entre ces aires (qui seront notées [Lip09] pour la résonance à 0,9 ppm par exemple), en prenant soin de normaliser ces valeurs par rapport au nombre de protons contribuant à chaque résonance, qu'il est possible de dériver la composition en AG, dont les différents types ont été présentés dans le chapitre 2 au paragraphe 2.4.1. Les algorithmes définis dans la

littérature [16–20] proposent différents rapports, notamment différentes résonances utilisées comme référence. De plus, certains de ces algorithmes entrent plus dans le détail de la composition des AG, allant jusqu’à quantifier les AG poly-insaturés de type ω_3 présentant trois insaturations [17], alors que d’autres ne s’intéressent qu’à la différenciation des AGS et AGI [18]. Enfin, l’ordre de détermination des fractions des AG n’est pas la même dans chaque algorithme, propageant différemment les erreurs de mesure et de calcul.

4.1.1 Algorithme de *Zancanaro et al.*

Cet algorithme est le premier (publié en 1994 [16]) à avoir proposé la quantification par SRM des lipides présents dans le tissu adipeux du rat, en distinguant quatre groupes, à savoir les AGS et les AGI, eux-mêmes comprenant les AGMI et AGPI. Ce travail a été réalisé *ex vivo* à partir de spectres RMN acquis à haut champ magnétique (11,7 T). En plus de la quantification des AG, une mesure de la longueur de chaîne moyenne des AG est présentée.

La quantification des AG se fait à partir de trois résonances :

- *Lip53+52* associée aux protons de la (ou des) double(s) liaison(s) présente(s) sur les molécules d’AGI ;
- *Lip28* correspondant aux protons des groupements méthylènes entourés de deux doubles liaisons, uniquement présents sur les AGPI ;
- *Lip09*, résonance des groupements méthyles terminaux de chaque molécule d’AG.

Les groupements méthyles, terminaison de chaque molécule d’AG, étant présents une seule fois par molécule, la résonance associée (*Lip09*) est utilisée comme référence pour le calcul de composition en AG de cet algorithme. Cette résonance étant produite par la participation de trois protons, et les deux autres résonances par la participation de deux protons, des facteurs correctifs sont nécessaires pour normaliser les aires sous la courbe de chaque résonance à la participation d’un seul proton.

Les fractions d’AGI et d’AGPI sont calculées comme suit :

$$AGI = 100 \cdot \frac{3}{2} \cdot \frac{[Lip53 + 52]}{[Lip09]} \quad ; \quad AGPI = 100 \cdot \frac{3}{2} \cdot \frac{[Lip28]}{[Lip09]} \quad (4.1)$$

L’inconvénient de cet algorithme est que le calcul des AGI est souvent surévalué puisque les doubles liaisons présentes sur une seule molécule d’AGPI vont être

comptées séparément, comme s'il ne s'agissait que de molécules mono-insaturées.

Les fractions d'AGMI et d'AGS sont dérivées des résultats de calcul des fractions d'AGI et d'AGPI :

$$AGMI = AGI - AGPI \quad ; \quad AGS = 100 - AGI \quad (4.2)$$

On remarque que l'erreur faite sur la fraction d'AGI sera répercutée lors du calcul de ces deux dernières fractions. De plus, l'utilisation de cet algorithme semble compromise dans une problématique hépatique *in vivo* en raison de la forte présence d'eau, dont la résonance est proche de la résonance *Lip53+52* qui sera donc moins aisée à quantifier que sur un spectre de tissu adipeux. Enfin, la résonance *Lip53+52* est considérée dans la plupart des études comme associée aux protons des doubles liaisons, cependant les protons des groupements méthylènes de la chaîne de glycérol reliant les trois chaînes d'AG des triglycérides y participent également. Des calculs complémentaires, utilisant les résonances *Lip41* et *Lip43* issues des autres protons de la chaîne de glycérol, sont proposés dans le but de minimiser cette erreur, mais encore une fois, ces résonances sont difficilement quantifiables de manière robuste à plus bas champ magnétique et dans le cadre d'applications *in vivo*.

4.1.2 Algorithme de *Yeung et al.*

Cet algorithme de quantification des AG [17] est présenté dans un but informatif car ne sera pas applicable à nos données dans nos conditions expérimentales. En effet, il a été proposé pour l'étude à haut champ magnétique (11,7 T) des lipides présents dans la moelle osseuse prélevée sur des patients, donc *ex vivo* [17], et prend en compte la présence d' ω_3 . Or, ces ω_3 n'étant pas produits par notre organisme, et souvent en très faible quantité dans l'apport alimentaire, ils ne sont présents qu'en très faible concentration dans la plupart des organes (foie et sein par exemple) [88]. Ceci induit une détection compliquée de leur résonance caractéristique, même si certains travaux s'y intéressent dans le cas du tissu adipeux [89]. La quantification des AG suivant cet algorithme utilise les résonances ci-après :

- ω_3 , dûe aux groupements méthyles finaux des chaînes d'AG ω_3 , se trouvant entre les résonances *Lip09* et *Lip13* sur le spectre (entre 0,94 et 1,03 ppm) ;
- *Lip09*, pour les groupements méthyles terminaux de toutes molécules d'AG (y compris ω_3) ;
- *Lip28* étant un marqueur de doubles liaisons multiples dans la molécule, le

groupement chimique associé sera présent une fois pour un AG di-insaturé et deux fois pour un AG tri-insaturé ;

- *Lip21*, associée aux protons des groupements méthylènes entourant les doubles liaisons, apparaissant sur chaque molécule insaturée ;
- *Lip23*, utilisée comme référence, correspondant au groupement méthylène en α de la chaîne de glycérol, présent une fois sur chaque molécule d'AG.

Encore une fois, une normalisation du nombre de protons participant aux différentes résonances est nécessaire. En effet, pour les résonances *Lip28* et *Lip23*, deux protons sont concernés à chaque fois, alors que pour la résonance *Lip21*, quatre protons entrent en jeu. Pour les résonances *Lip ω_3* et *Lip09*, trois protons participent à la résonance, cependant elles ne sont pas utilisées en combinaison avec les autres résonances de l'algorithme.

La fraction des AG tri-insaturés (ω_3) est calculée de la sorte :

$$AG_{\omega_3} = 100 \cdot \frac{[Lip\omega_3]}{[Lip\omega_3] + [Lip09]} \quad (4.3)$$

La fraction d'AG di-insaturés (ω_6 , appelées AGPI dans tous les autres algorithmes) est dépendante du premier calcul effectué :

$$AGPI = 100 \cdot \frac{[Lip28]}{[Lip23]} - 2 \cdot AG_{\omega_3} \quad (4.4)$$

La fraction d'AGMI est alors déterminée :

$$AGMI = 100 \cdot \frac{[Lip21]}{[Lip23]} - AGPI - AG_{\omega_3} \quad (4.5)$$

A partir de ces trois résultats, les fractions d'AGI et AGS sont déduites :

$$AGI = AGMI + AGPI + AG_{\omega_3} \quad ; \quad AGS = 100 - AGI \quad (4.6)$$

La première fraction calculée est celle correspondant aux ω_3 . On remarque ensuite que cette fraction intervient dans les calculs de toutes les autres fractions d'AG. En raison de la très faible concentration d' ω_3 attendue dans les organes *in vivo* et donc de la difficulté à les détecter, une erreur non négligeable sur le calcul de cette fraction est susceptible d'exister. Dans le cas d'une application *in vivo*, cette erreur serait ensuite répercutée sur tous les autres calculs, entraînant une quantification erronée de la composition en AG des lipides.

4.1.3 Algorithmes de *Strobel et al.* et de *Ren et al.*

Ces deux algorithmes, quasiment identiques et publiés la même année (2008), sont utilisés dans le cadre de la quantification de la composition de lipides du tissu adipeux chez la souris [18], du tissu adipeux et de la moelle osseuse chez l'Homme [19], à 7,0 T. La seule différence réside dans la considération de la fraction d'AG tri-insaturés (ω_3). *Strobel et al.* proposent l'utilisation d'une valeur fixée pour la fraction d' ω_3 , permettant ainsi d'évaluer l'effet d'une augmentation de cette fraction. Les calculs des fractions d'AG sont alors semblables à ceux de l'algorithme précédent (*Yeung et al.* [17]). En raison de la très faible concentration d' ω_3 attendue *in vivo*, *Ren et al.* ont choisi de ne pas en tenir compte, faisant l'hypothèse d'une fraction nulle d'AG tri-insaturés (ω_3). Ces deux études proposent un calcul de la longueur de chaîne moyenne des AG présents dans l'échantillon observé. Cependant, ce calcul ne semble pas applicable à un autre tissu que le tissu adipeux, contrairement à celui proposé par *Zancanaro et al.* [16]. En effet, *Strobel et al.* et *Ren et al.* utilisent des connaissances *a priori* à propos des longueurs de chaîne d'AG saturés et insaturés les plus rencontrées dans les tissus adipeux [90,91] pour la définition de coefficients utilisés dans leurs calculs.

Pour la suite de ce chapitre, le choix a été fait de n'utiliser que l'algorithme défini par *Ren et al.* étant donné les faibles concentrations en ω_3 attendues dans des applications *in vivo*. Pour la quantification des AG suivant cet algorithme, les résonances utiles sont :

- *Lip28*, afin d'évaluer la quantité d'AGPI ;
- *Lip21*, associée à toute molécule d'AG insaturé ;
- *Lip23*, utilisée comme référence, car issue d'un groupement méthylène présent sur chaque molécule d'AG.

Pour chacune des résonances *Lip23* et *Lip28*, deux protons y participent. En revanche, la résonance *Lip21* étant associée aux groupements chimiques se situant aux extrémités des doubles liaisons (donc apparaissant deux fois sur un même AG insaturé), quatre protons y participent. Un facteur correctif d' $1/2$ devra donc être appliqué lors du calcul utilisant les résonances *Lip21* et *Lip23*.

La fraction d'AGPI est la première à être calculée :

$$AGPI = 100. \frac{[Lip28]}{[Lip23]} \quad (4.7)$$

Cette dernière est ensuite utilisée pour dériver la fraction d'AGMI :

$$AGMI = 100 \cdot \frac{1}{2} \cdot \frac{[Lip21]}{[Lip23]} - AGPI \quad (4.8)$$

On remarque que la fraction d'AGI peut être calculée directement à partir des résonances *Lip21* et *Lip23*, ou déduite des valeurs d'AGMI et AGPI précédentes :

$$AGI = 100 \cdot \frac{1}{2} \cdot \frac{[Lip21]}{[Lip23]} = AGMI + AGPI \quad (4.9)$$

Enfin, la fraction d'AGS :

$$AGS = 100 - AGI \quad (4.10)$$

Du fait des deux voies de quantification de la fraction d'AGI, il est possible de limiter la propagation d'erreur en réduisant les dépendances des fractions d'AG les unes avec les autres. Cet algorithme est souvent cité comme référence d'attribution des résonances pour des études cliniques et pré-cliniques sur du tissu adipeux ou de la moelle osseuse n'effectuant pas forcément de quantification détaillée des AG [89,92,93]. En revanche, il a été utilisé dans deux études cliniques récentes sur du tissu mammaire *in vivo* à 7,0 T [94,95].

4.1.4 Algorithme de *Corbin et al.*

Ce dernier algorithme [20] est présenté dans le cadre d'une étude pré-clinique à 4,7 T concernant les quantifications des lipides hépatiques *in vivo* dans le cas d'une stéatose non-alcoolique. Il est inspiré des travaux de *Zancanaro et al.* [16] puisque la résonance *Lip09* est utilisée comme référence ; cependant le calcul de la fraction d'AGI est différent.

Les résonances mises en œuvre pour la quantification des AG sont :

- *Lip21*, pour la mesure de la fraction d'AGI car associée aux protons des groupements méthylènes entourant les doubles liaisons ;
- *Lip28*, permettant la distinction entre AGI et AGPI puisque correspondant aux protons des groupements méthylènes entourés par deux doubles liaisons ;
- *Lip09*, utilisée comme référence, issue des protons des groupements méthyles terminaux de chaque molécule d'AG.

Le nombre de protons participant aux résonances *Lip21*, *Lip28* et *Lip09* étant de quatre, deux et trois, respectivement, des facteurs correctifs sont nécessaires pour ramener ces quantités à des valeurs comparables.

Les fractions d'AGI et d'AGPI sont calculées séparément :

$$AGI = 100 \cdot \frac{3}{4} \cdot \frac{[Lip21]}{[Lip09]} \quad ; \quad AGPI = 100 \cdot \frac{3}{2} \cdot \frac{[Lip28]}{[Lip09]} \quad (4.11)$$

Les fractions d'AGMI et d'AGS en sont alors déduites :

$$AGMI = AGI - AGPI \quad ; \quad AGS = 100 - AGI \quad (4.12)$$

De la même manière que pour l'algorithme de *Ren et al.* [19], deux fractions sont calculées indépendamment l'une de l'autre, permettant de limiter la propagation d'erreur par rapport aux algorithmes dérivant toutes les fractions d'AG à partir d'une valeur calculée au départ. Enfin, cet algorithme est cité lors d'études pré-cliniques sur modèles murins [69, 70, 96] sur le foie. Il est utilisé dans le cas d'une pathologie hépatique telle que la fibrose ou la stéatose, à différents le champs magnétiques, de 7,0 T pour l'une [69] et 3,0 T pour l'autre [70]. La dernière étude utilise l'algorithme de Corbin *et al.* dans le cas d'une faible infiltration lipidique, mais à un champ magnétique élevé de 14,1 T [96].

4.1.5 Corrections en T_1 et/ou T_2

En fonction des paramètres d'acquisitions (TR et TE), il peut être nécessaire d'appliquer une correction en T_1 et/ou T_2 des résonances utilisées lors des calculs de quantification.

La correction en T_1 de la valeur de l'aire sous la courbe, ou concentration, pour une résonance quelconque (notée Lip pour l'exemple), est calculée de la manière suivante :

$$[Lip] = [Lip]_0 \cdot \left(\frac{1}{1 - \exp\left(-\frac{TR}{T_1}\right)} \right) \quad (4.13)$$

où $[Lip]_0$ est la valeur de l'aire sous la courbe relevée avant correction, et $[Lip]$ la valeur corrigée.

De la même façon, la correction en T_2 est faite avec l'équation :

$$[Lip] = [Lip]_0 \cdot \exp\left(-\frac{TE}{T_2}\right) \quad (4.14)$$

Enfin, il est possible, dans le cas où les deux corrections sont nécessaires, de les appliquer en une seule opération :

$$[Lip] = [Lip]_0 \cdot \left(\frac{1}{1 - \exp\left(-\frac{TR}{T_1}\right)} \right) \cdot \exp\left(-\frac{TE}{T_2}\right) \quad (4.15)$$

De manière générale, les acquisitions sont réalisées avec un TR suffisamment long (2000 ms à 7,0 T [19] ; 5000 ms à 3,0 T [76] ; 2500 ms dans notre étude à 4,7 T) pour obtenir une relaxation longitudinale complète de l'aimantation pour chacune des résonances du spectre. Il est important de noter que dans le cas d'un spectre issu d'un volume dans lequel de l'eau et des lipides sont présents, la résonance ayant la valeur de T_1 la plus élevée est celle de l'eau (663 ms à 1,5 T [41] ; 822 ± 123 ms à 3,0 T dans le foie humain par exemple). Les études utilisant une correction en T_1 sont donc rares [19, 41], que ce soit à des valeurs de champ élevées ou non, sur le foie ou le tissu adipeux. En revanche, une correction en T_2 est souvent utilisée [10, 15, 18, 19, 41, 94, 97] en raison des valeurs comparables entre le TE utilisé lors des acquisitions (20 ms à 3,0 T [76] ; 20 ms à 7,0 T [19]) et les valeurs de T_2 relevées pour les résonances lipidiques (50 ms à 1,5 T [41] ; 34 ms à 3,0 T [98] pour la résonance *Lip13* dans le foie humain).

4.2 Validation des algorithmes sur objets-tests

Devant l'étendue des algorithmes de quantification de la composition des lipides proposés dans la littérature, il est apparu important de tester ces derniers dans nos conditions expérimentales, tout en restant dans un scénario idéal ou aucun mouvement n'est à prendre en compte contrairement aux conditions *in vivo*, afin de déterminer celui qui nous serait le plus approprié. Pour ce faire, des objets-tests ont été préparés, allant des plus simples, des tubes remplis de différentes huiles alimentaires, à des objets-tests modélisant un tissu biologique, c'est à dire des émulsions stables de type huile dans l'eau, avec différentes concentrations en huile.

4.2.1 Validation sur différentes huiles alimentaires

Le but du travail sur une huile est de pouvoir évaluer les algorithmes de quantification proposés sur un échantillon dont la composition des lipides (AGS, AGI, AGPI et AGMI) est connue, et variable en fonction de l'huile utilisée [99]. Ceci dans des conditions expérimentales simples, par rapport à la validation sur émul-

sions huile/eau, puisque l'on est en présence d'un échantillon pur (sans présence d'eau) et homogène.

Préparation des objets-tests

Quatre huiles ont été choisies pour leurs compositions lipidiques : l'huile de colza, l'huile de noix, l'huile d'olive et l'huile de tournesol dont les fractions en AG sont présentées dans le tableau 4.1.

	Colza	Noix	Olive	Tournesol
AGS	8	10	15	11
AGI	92	90	86	89
AGMI	62	18	77	23
AGPI	30	72	9	66
$\omega 6$	21	59	7	65
$\omega 3$	9	13	2	1

TABLEAU 4.1 – *Composition détaillée en acides gras (AG) des huiles utilisées. Les fractions en AG sont présentées en %.*

Ainsi, les algorithmes ont été évalués dans le cas :

- d'une huile quasiment dépourvue d' ω_3 mais dont les AGPI sont largement majoritaires par rapport aux AGMI (huile de tournesol) ;
- d'une huile quasiment dépourvue d' ω_3 mais qui, à l'inverse de la précédente, est majoritairement composée d'AGMI et non d'AGPI (huile d'olive) ;
- d'une huile présentant une fraction d' ω_3 modérée, dont les AGI sont principalement représentés par les AGMI (huile de colza) ;
- d'une huile avec une fraction d' ω_3 un peu plus élevée et une forte fraction d'AGMI (huile de noix).

Quatre tubes FALCON de 50 ml ont été préparés, chacun contenant l'une des huiles choisies. Toutes les acquisitions ont été réalisées à température ambiante (20°C).

Protocole d'acquisition

Toutes les acquisitions ont été faites à 4,7 T sur un spectromètre imageur dédié au petit animal (47/40 USR Bruker Biospec, Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen, Germany), avec un canon de gradient BGA12 (force maximum de 400 mT/m) et

une bobine RF volumique en quadrature de 72 mm de diamètre interne. Les logiciels d'acquisition et de traitement *ParaVision 4.0* (Bruker Biospin, Wissembourg, France) et *Topspin 1.5*, respectivement, ont été utilisés.

Les tubes d'huile de colza et tournesol ont été utilisés pour la mesure des temps de relaxation T_1 et T_2 des différentes résonances. Les spectres de SRM ont été acquis dans un voxel de $5 \times 5 \times 5$ mm³ avec une séquence PRESS utilisant les paramètres suivants :

- pour la mesure du T_1 (durée totale des acquisitions = 20 min) :
 - $TR = [145; 170; 200; 240; 270; 350; 400; 800; 1600; 2000; 2500]$ ms;
 - $TE = 11$ ms;
 - nombre d'accumulations = 128;
 - nombre de "dummy scans" = 4;
- pour la mesure du T_2 (durée totale des acquisitions = 28 min) :
 - $TR = 1600$ ms;
 - $TE = [11; 20; 30; 40; 50; 80; 100; 150]$ ms;
 - nombre d'accumulations = 128;
 - nombre de "dummy scans" = 4;
- pour le calcul de quantification (durée de l'acquisition = 5 min 30 s) :
 - $TR = 2500$ ms;
 - $TE = 11$ ms;
 - nombre d'accumulations = 128;
 - nombre de "dummy scans" = 4.

Les acquisitions étant faites sur des huiles pures, aucun module de suppression du signal de l'eau n'a été utilisé.

Les spectres ont ensuite été exploités en utilisant le logiciel *LCModel* (Version 6.3-0L, Stephen Provencher, Oakville, ON, Canada) utilisant la base simulée "Lipid-8" et le paramètre "roomt = True" afin de prendre en compte la température ambiante (20°C) pour le déplacement chimique des lipides. Aucune connaissance *a priori* n'a été introduite.

Résultats de mesure du T_1 et T_2 des différentes résonances lipidiques

Par la mesure du T_1 et du T_2 sur les huiles de colza et de tournesol, des valeurs moyennes pour les temps de relaxation de toutes les résonances associées aux lipides ont pu être déterminées dans nos conditions expérimentales.

	T_1	T_2
Lip09	524 ± 20	44 ± 14
Lip13	314 ± 11	51 ± 2
Lip16	255 ± 29	19 ± 22
Lip21	292 ± 14	31 ± 17
Lip23	256 ± 18	30 ± 10
Lip28	294 ± 4	45 ± 7
Lip53+52	498 ± 18	41 ± 8

TABLEAU 4.2 – Valeurs moyennes des temps de relaxation longitudinale (T_1) et transversale (T_2), exprimées en ms, pour chaque résonance du spectre des lipides, mesurées sur les huiles de tournesol et colza à 4,7 T.

Beaucoup de valeurs de T_2 , pour l'eau et la résonance majeure des lipides (*Lip13*), sont énoncées dans la littérature. Cependant, les mesures étant faites sur des objets-tests différents, sur de nombreux tissus, et à des valeurs de champs magnétiques variés, il est difficile d'effectuer une comparaison entre nos résultats et ceux de ces multiples études. Une seule étude a été réalisée sur des émulsions ainsi que sur le foie de souris à 3,0 T, et dont les valeurs de T_2 mesurées pour la plupart des résonances lipidiques semblent correspondre à nos valeurs présentées dans le tableau 4.2 [10]. Il est important de noter que, en fonction du tissu sur lequel les mesures sont effectuées, ainsi que du champs magnétique utilisé, de grandes variations peuvent être observées pour les valeurs de T_2 d'une étude à l'autre [10, 18, 41, 93, 94, 100–102]. Enfin, les valeurs de T_2 mesurées dans nos conditions expérimentales sont du même ordre de grandeur (pour la résonance *Lip16*) ou plus élevées que le TE utilisé (11 ms) pour les acquisitions de SRM ayant pour but la quantification de la composition lipidique. Il paraît alors intéressant d'évaluer l'effet d'une correction en T_2 avant de procéder au calcul des fractions d'AG composant les lipides.

De même, les valeurs de T_1 que nous avons mesurées pour les différentes résonances des AG sont du même ordre de grandeur que des valeurs publiées dans la littérature. Cependant, ces études n'ont pas été réalisées sur des huiles, ou aux mêmes champs magnétiques [10, 41, 93, 100]. D'autre part, une étude travaillant sur des émulsions, avec une quantité variable de lipides, a mis en évidence une nette variation du T_1 en fonction de la fraction lipidique [21]. Si tel est le cas, et si une correction en T_1 est nécessaire avant le calcul de la composition lipidique, la valeur de T_1 de chaque résonance d'intérêt devra être mesurée au début de chaque protocole d'acquisition, pour chaque objet-test, animal ou patient. La méthode de

référence actuelle pour la mesure du T_1 est l'acquisition de plusieurs spectres à des valeurs de TR différentes pour observer la recroissance de l'aimantation longitudinale. Dans le domaine clinique, cette méthode peut se révéler longue à appliquer, nécessitant des apnées répétées du patient. Des travaux ont été effectués pour permettre une mesure rapide du T_1 en clinique, mais cela nécessite l'utilisation d'une séquence non disponible nativement sur les spectromètres imageurs des hôpitaux [100]. Dans le domaine pré-clinique, la mesure du T_1 par l'acquisition de spectres à différents TR n'est pas applicable en raison de la synchronisation des acquisitions avec la respiration de l'animal (*cf* chapitre 5), ayant pour conséquence une variation du TR réellement appliqué par rapport à la valeur consigne.

Dans nos conditions expérimentales, le TR utilisé (2500 ms) est de l'ordre de cinq fois les T_1 les plus longs parmi ceux relevés pour les résonances lipidiques, d'où une relaxation quasi-complète de l'aimantation longitudinale de ces résonances. Aucune correction en T_1 n'a donc été nécessaire.

Résultats de quantification de la composition lipidique

Pour chacune des quatre huiles utilisées, les algorithmes de *Corbin et al.*, *Ren et al.* et *Zancanaro et al.* ont été utilisés, sans et avec correction en T_2 préalable (la notation utilisée dans les tableaux qui vont suivre est, respectivement, noCorr et Corr), pour le calcul de la quantification de la composition lipidique. Comme exposé précédemment, la résolution spectrale de ces expériences ne permettant pas l'observation de la résonance associée aux ω_3 , l'hypothèse de la seule présence d'AG di-insaturés (ω_6) est faite pour ces calculs. Les fractions calculées sont donc celles des acides gras saturés, insaturés, mono-insaturés et poly-insaturés (AGS, AGI, AGMI et AGPI, respectivement). Pour chacune des fractions calculées, les résultats sont présentés sous la forme "valeur \pm erreur". L'erreur est dérivée des valeurs de CRLB relevées pour les résonances utilisées dans le calcul de la fraction d'AG.

Huile de tournesol

Le spectre obtenu sur le tube d'huile de tournesol est présenté sur la figure 4.1. Par l'évaluation de la largeur à mi-hauteur (FWHM pour *Full Width at Half Maximum* en anglais) de la résonance principale des lipides *Lip13*, une excellente résolution spectrale est observée (FWHM = 12,4 Hz) étant données nos conditions d'expérimentation (4,7 T, voxel isotropique de 5 mm de côté). Toutes les réso-

nances sont dissociées les une des autres, même les plus proches telles que *Lip13* et *Lip16*, ou *Lip21* et *Lip23*. Le tableau 4.3 présente les résultats de quantification obtenus pour l'huile de tournesol avec les trois algorithmes testés, sans ou avec correction en T_2 .

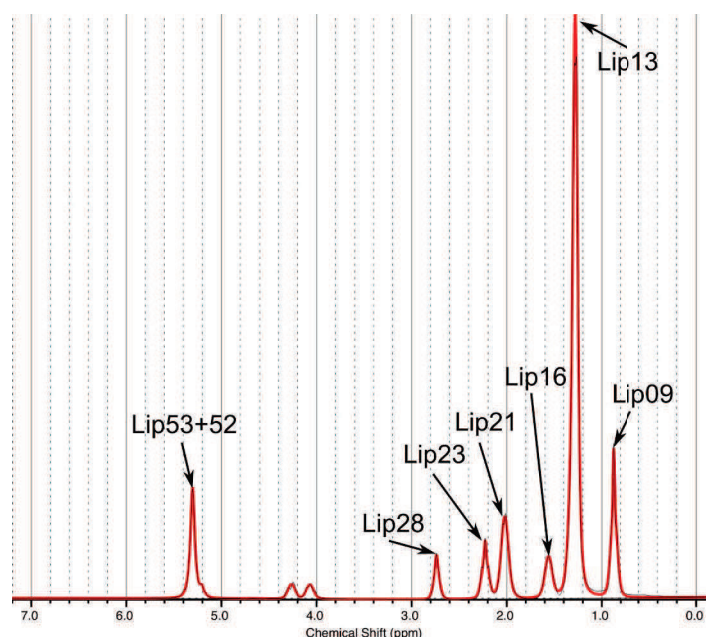


FIGURE 4.1 – Spectre de SRM acquis à 4,7 T sur un tube d'huile de tournesol ($FWHM = 12,4$ Hz).

	<i>Corbin et al.</i>		<i>Ren et al.</i>	
	noCorr	Corr	noCorr	Corr
AGS	$30,5 \pm 1,4$	$30,5 \pm 1,4$	$3,8 \pm 8,0$	$3,8 \pm 8,0$
AGI	$69,5 \pm 1,4$	$69,5 \pm 1,4$	$96,2 \pm 8,0$	$96,2 \pm 8,0$
AGMI	$21,6 \pm 3,8$	$21,6 \pm 3,8$	$29,9 \pm 4,0$	$29,9 \pm 4,0$
AGPI	$47,9 \pm 2,4$	$47,9 \pm 2,4$	$66,3 \pm 4,0$	$66,3 \pm 4,0$
<i>Zancanaro et al.</i>				
	noCorr	Corr		
AGS	$-43,1 \pm 5,7$	$-35,8 \pm 5,4$		
AGI	$143,1 \pm 5,7$	$135,8 \pm 5,4$		
AGMI	$95,2 \pm 8,1$	$87,9 \pm 7,8$		
AGPI	$47,9 \pm 2,4$	$47,9 \pm 2,4$		

TABEAU 4.3 – Résultats (en %) des calculs de quantification de la composition en AG de l'huile de tournesol sans ou avec correction en T_2 (noCorr ou Corr, respectivement.).

On remarque que la correction en T_2 n'apporte aucune amélioration aux résul-

tats de la quantification de la composition en AG des lipides de l'huile de tournesol. D'autre part, l'algorithme donnant une quantification la plus proche des valeurs attendues (tableau 4.1) est celui de *Ren et al.*. La fraction d'AGPI est conforme aux 66% théoriques. La fraction d'AGMI est légèrement surévaluée (29,9% au lieu de 23%), cette erreur se répercute ensuite sur les fractions d'AGI et AGS. Les deux autres algorithmes de quantification testés donnent des valeurs très éloignées de la composition réelle, voire complètement incohérentes en ce qui concerne l'algorithme de *Zancanaro et al.*.

Huile de colza

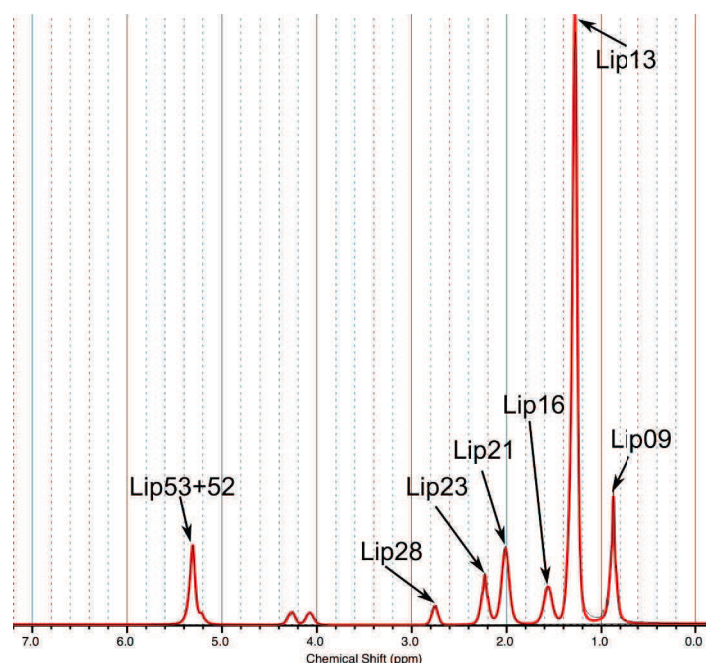


FIGURE 4.2 – Spectre de SRM acquis à 4,7 T sur un tube d'huile de colza ($FWHM = 11,4$ Hz).

Le spectre acquis sur le tube d'huile de colza est présenté en figure 4.2. De même que pour l'huile de tournesol, une excellente résolution spectrale est obtenue ($FWHM = 11,4$ Hz). Il est possible d'observer, quantitativement, la fraction d'AGPI différente dans cette huile par rapport à l'huile de tournesol par l'évaluation de l'amplitude de la résonance *Lip28* par rapport aux résonances *Lip21* et *Lip23*. En effet, la fraction d'AGPI est environ deux fois plus basse dans l'huile de colza que dans l'huile de tournesol, d'où une amplitude de la résonance *Lip28* diminuée sur le spectre acquis sur l'huile de colza.

	<i>Corbin et al.</i>		<i>Ren et al.</i>	
	noCorr	Corr	noCorr	Corr
AGS	32,5 \pm 1,4	39,2 \pm 1,2	2,7 \pm 4,5	1,6 \pm 5,1
AGI	67,5 \pm 1,4	60,8 \pm 1,2	97,3 \pm 4,5	98,4 \pm 5,1
AGMI	41,5 \pm 2,7	34,6 \pm 2,5	59,8 \pm 2,3	56,1 \pm 2,6
AGPI	26,0 \pm 1,3	26,2 \pm 1,3	37,5 \pm 2,2	42,3 \pm 2,5
<i>Zancanaro et al.</i>				
	noCorr	Corr		
AGS	-20,2 \pm 3,6	-18,0 \pm 3,6		
AGI	120,2 \pm 3,6	118,0 \pm 3,5		
AGMI	94,2 \pm 4,9	91,9 \pm 4,8		
AGPI	26,0 \pm 1,3	26,1 \pm 1,3		

TABEAU 4.4 – Résultats (en %) des calculs de quantification de la composition en AG de l’huile de colza sans ou avec correction en T_2 (noCorr ou Corr, respectivement.).

Le tableau 4.4 présente les résultats de quantification obtenus pour l’huile de colza avec les trois algorithmes testés, sans ou avec correction en T_2 . De même que pour l’huile de tournesol, l’algorithme de *Ren et al.* sans correction en T_2 donne les résultats les plus proches des valeurs théoriques attendues (tableau 4.1). Cette fois, la valeur d’AGPI est surévaluée (37,5% pour 30%), et la fraction d’AGMI est très proche de la valeur souhaitée (59,8% pour 62%). L’algorithme de *Corbin et al.* donne des résultats éloignés de la composition théoriques, et l’algorithme de *Zancanaro et al.* obtient à nouveau des valeurs incohérentes.

Huile de noix

Le spectre acquis sur le tube d’huile de noix est présenté sur la figure 4.3. La résolution spectrale permet l’identification de toutes les résonances lipidiques (FWHM de 12,4 Hz). Il est possible de supposer une forte fraction d’AGPI en raison de l’amplitude de la résonance *Lip28*.

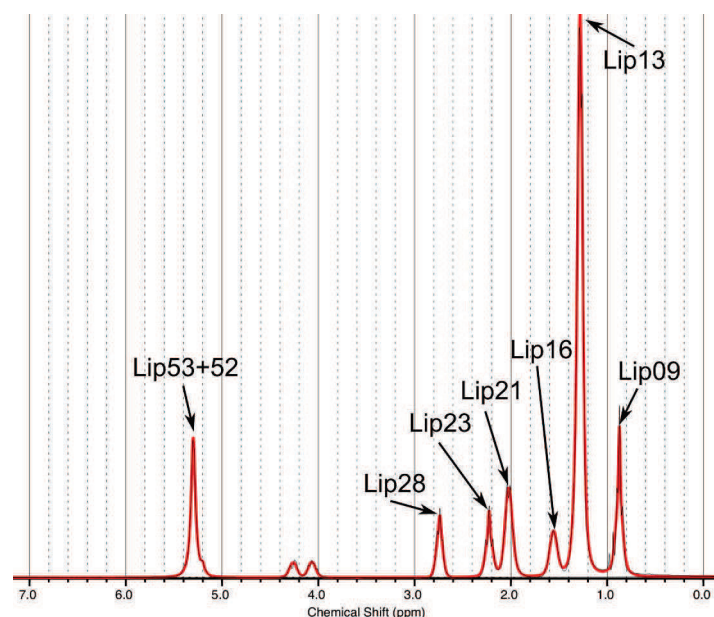


FIGURE 4.3 – Spectre de SRM acquis à 4,7 T sur un tube d’huile de noix ($FWHM=12,4$ Hz).

	<i>Corbin et al.</i>		<i>Ren et al.</i>	
	noCorr	Corr	noCorr	Corr
AGS	$30,4 \pm 1,4$	$30,4 \pm 1,4$	$5,6 \pm 10,9$	$5,6 \pm 10,9$
AGI	$69,6 \pm 1,4$	$69,6 \pm 1,4$	$94,4 \pm 10,9$	$94,4 \pm 10,9$
AGMI	$3,1 \pm 4,7$	$3,1 \pm 4,7$	$4,2 \pm 5,5$	$4,2 \pm 5,5$
AGPI	$66,6 \pm 3,3$	$66,6 \pm 3,3$	$90,2 \pm 5,4$	$90,2 \pm 5,4$

	<i>Zancanaro et al.</i>	
	noCorr	Corr
AGS	$-68,8 \pm 5,1$	$-60,1 \pm 4,8$
AGI	$168,8 \pm 5,1$	$160,1 \pm 4,8$
AGMI	$102,2 \pm 8,4$	$93,5 \pm 8,1$
AGPI	$66,6 \pm 3,3$	$66,6 \pm 3,3$

TABEAU 4.5 – Résultats (en %) des calculs de quantification de la composition en AG de l’huile de noix sans ou avec correction en T_2 (noCorr ou Corr, respectivement.).

Le tableau 4.5 expose les résultats de quantification des AG par les trois algorithmes testés, sans ou avec correction en T_2 . Pour cette huile, l’algorithme de *Zancanaro et al.* donne, comme pour les deux huiles précédentes, des valeurs incohérentes (à l’exception de la fraction d’AGPI). Les algorithmes de *Corbin et al.* et *Ren et al.* donnent des valeurs proches de la réalité pour différentes fractions d’AG (tableau 4.1). En effet, la fraction d’AGPI est plus cohérente avec l’algorithme de *Corbin et al.* (66,6% pour 72%) alors qu’elle est fortement surévaluée

par l'algorithme de *Ren et al.* (90,2% pour 72%). Les fractions d'AGMI issues des calculs de ces deux algorithmes sont proches l'une de l'autre, et très sous-estimées par rapport à la valeur attendue (3,1% et 4,2% pour 18%). En ce qui concerne les fractions d'AGI et AGS, c'est le calcul de *Ren et al.* qui produit les résultats les plus appropriés. La différence majeure entre ces deux algorithmes est la résonance utilisée comme référence (*cf* §4.1.3 et 4.1.4), et dans le cas de cette huile, il semble difficile de conclure en faveur de l'un ou l'autre. L'algorithme de *Ren et al.* est plus précis sur la composition générale en AGS et AGI, cependant, il présente un écart important avec la théorie concernant la fraction d'AGPI. En revanche, l'algorithme de *Corbin et al.* évalue très bien les AGPI, mais ne quantifie pas correctement les AGS et AGI. D'autre part, pour les trois algorithmes testés, il apparaît évident que la correction en T_2 n'apporte aucune amélioration.

Huile d'olive

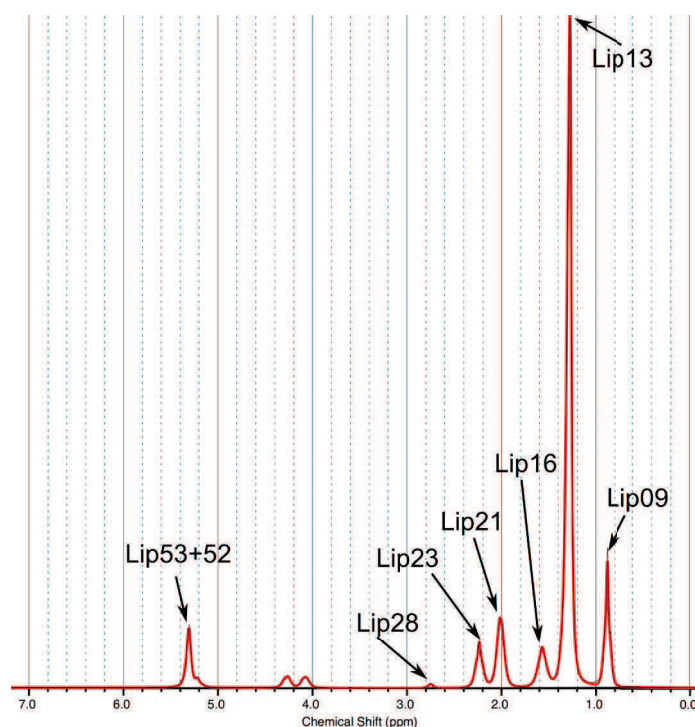


FIGURE 4.4 – Spectre de SRM acquis à 4,7 T sur un tube d'huile d'olive (FWHM=10,4 Hz).

Le spectre obtenu sur le tube d'huile d'olive est présenté en figure 4.4. La résonance *Lip28* est très peu visible malgré une bonne résolution spectrale (FWHM de 10,4 Hz), ce qui illustre très bien la faible fraction d'AGPI attendue dans le cas

de cette huile.

	<i>Corbin et al.</i>		<i>Ren et al.</i>	
	noCorr	Corr	noCorr	Corr
AGS	30,1 \pm 1,4	30,1 \pm 1,4	11,9 \pm 1,5	11,9 \pm 1,5
AGI	69,9 \pm 1,4	69,9 \pm 1,4	88,1 \pm 1,5	88,1 \pm 1,5
AGMI	63,9 \pm 1,7	63,9 \pm 1,7	80,5 \pm 0,8	80,5 \pm 0,8
AGPI	6,0 \pm 0,3	6,0 \pm 0,3	7,6 \pm 0,8	7,6 \pm 0,8
<hr/>				
	<i>Zancanaro et al.</i>			
	noCorr	Corr		
AGS	-1,1 \pm 2,0	4,0 \pm 1,9		
AGI	101,1 \pm 2,0	96,0 \pm 1,9		
AGMI	95,1 \pm 2,6	89,9 \pm 2,5		
AGPI	6,0 \pm 0,6	6,0 \pm 0,6		

TABLEAU 4.6 – Résultats (en %) des calculs de quantification de la composition en AG de l’huile d’olive sans ou avec correction en T_2 (noCorr ou Corr, respectivement.).

Une nouvelle fois, les résultats obtenus avec l’algorithme de *Zancanaro et al.* sont très éloignés des valeurs attendues (tableau 4.1), voire incohérents pour les fractions d’AGS et AGI, à l’exception de la fraction d’AGPI (tableau 4.6). L’algorithme de *Corbin et al.* donne des valeurs d’AGMI et AGPI sous-estimées (63,9% pour 77% et 6,0% pour 7%, respectivement), et des valeurs de fractions d’AGS et AGI très loin de celles attendues. Pour cette huile, l’algorithme de *Ren et al.* est le plus précis avec une faible sous-estimation des valeurs d’AGPI et AGS (7,6% pour 9% et 11,9% pour 15%, respectivement), et une surestimation des valeurs d’AGI et AGMI (88,1% pour 86% et 80,5% pour 77%, respectivement). Ici, la conclusion est en faveur de ce dernier algorithme, sans correction en T_2 . Le tableau 4.6 présente les résultats de quantification obtenus pour l’huile d’olive avec les trois algorithmes testés, sans ou avec correction en T_2 .

Discussion

L’évaluation des algorithmes de quantification sur des objets-tests simples ont permis l’élimination de celui de *Zancanaro et al.* pour la suite de notre étude. L’algorithme de *Ren et al.* semble le plus approprié, cependant les calculs issus de l’algorithme de *Corbin et al.* se sont révélés plus précis concernant la fraction d’AGPI sur l’une des huiles. Il est donc apparu intéressant de conserver ces deux algorithmes pour l’étape d’évaluation sur des émulsions. Aucun effet n’ayant été

observé sur les résultats obtenus par les trois algorithmes après application d'une correction en T_2 , cette correction ne sera pas utilisée dans la suite de notre étude.

4.2.2 Validation sur des émulsions avec différentes fractions lipidiques

L'intérêt des émulsions est de mimer le tissu hépatique par la présence d'eau et de lipides mélangés de façon relativement homogène. De plus, la préparation de ces objets-tests présente l'avantage de pouvoir obtenir la fraction lipidique souhaitée afin de simuler une infiltration lipidique légère ou modérée. De cette manière, les algorithmes de calcul de la composition en AG des lipides peuvent être évalués dans un contexte plus proche de la réalité.

Préparation des objets-tests

Les émulsions ont été préparées à partir d'huile de colza. Cette huile a été choisie dans le but de simuler un éventuel biais de quantification en raison de l'omission de la fraction d' ω_3 lors des calculs, car elle n'est pas dépourvue d' ω_3 . Afin de modéliser plusieurs grades d'infiltration lipidique, six émulsions ont été préparées, allant d'une FL de 5% (définition de la stéatose de grade 1, cf §2.3.1) à 40% (infiltration modérée, grade 2).

La composition de chaque émulsion a été la suivante :

- solution d'eau distillée et d'agar-agar à 1,5% (proportion variable) ;
- huile de colza (proportion variable) ;
- gadolinium (0,2 mmol/L) ;
- émulsifiant (15 mmol/L).

Le gadolinium est ajouté pour diminuer le T_1 du mélange, dans le but de s'approcher de la valeur de 760 ± 50 ms mesurée par *Nekkolla et al.* sur le foie de rat à 4,7 T [103]. La stabilité des émulsions dans le temps est assurée par l'ajout d'agar-agar au mélange, entraînant la gélification de la préparation.

Ainsi, six tubes FALCON de 50 ml ont été préparés, présentant des fractions lipidiques de 5%, 10%, 15%, 20%, 30% et 40%. L'obtention d'une émulsion stable au dessus d'une FL de 40% s'est révélée compliquée, expliquant le choix de ne pas simuler une stéatose de grade plus élevé.

Protocole d'acquisition

Les acquisitions ont été réalisées avec la même installation que pour les objets-tests d'huiles pures, à 4,7 T (*cf* §4.2.1 page 99). Sur chaque tube, un spectre de SRM a été obtenu dans un voxel isotropique de 5 mm de côté par l'utilisation d'une séquence PRESS et les paramètres d'acquisition suivants (durée de l'acquisition = 10 min 50 s) :

- $TR = 2500$ ms ;
- $TE = 11$ ms ;
- nombre d'accumulations = 256 ;
- nombre de "dummy scans" = 4.

Suite aux résultats présentés dans le chapitre 3, aucune suppression du signal de l'eau n'a été appliquée.

Les spectres ont ensuite été exploités en utilisant le logiciel *LCModel*, utilisant la base simulée "Lipid-8" et le paramètre "roomt = True" afin de prendre en compte la température ambiante (20°C) pour le déplacement chimique des lipides. Aucune connaissance *a priori* n'a été introduite.

Résultats de quantification de la composition lipidique

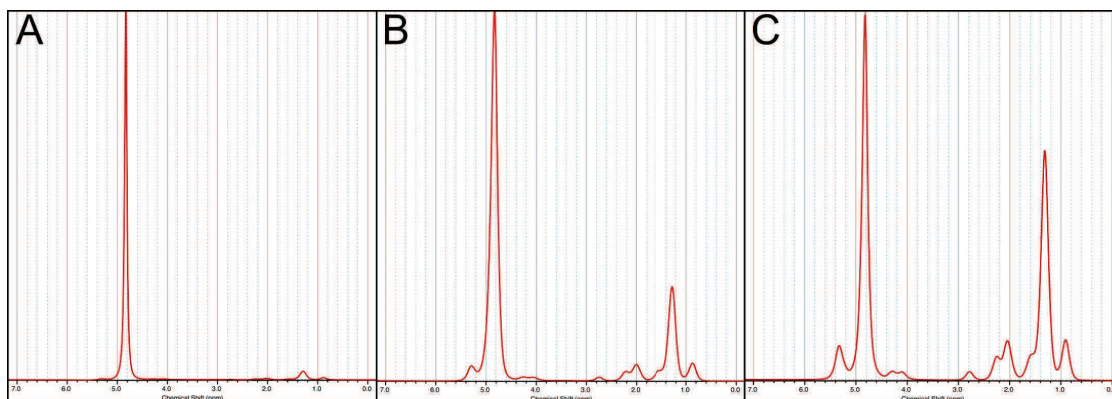


FIGURE 4.5 – Spectres de SRM acquis à 4,7 T sur des tubes d'émulsions dont la fraction lipidique est de (A) 5% présentant une FWHM de 12,2 Hz, (B) 20% présentant une FWHM de 31,8 Hz et (C) 40% présentant une FWHM de 29,8 Hz.

La figure 4.5 présente les spectres acquis sur trois des tubes d'émulsions utilisés. Une très bonne qualité spectrale est observée, et ce même avec l'augmentation de la fraction lipidique. Ce constat peut être étendu à tous les spectres acquis sur les émulsions avec une moyenne de FWHM de 26,5 Hz pour une gamme de valeurs

allant de 12,2 Hz à 38,2 Hz. Ceci a permis une quantification suffisamment précise des résonances associées aux lipides par *LCModel* (CRLB<10%) dès la plus faible quantité de lipides considérée par ces objets-tests (5%).

	Emulsion à 5%		Emulsion à 10%	
	<i>Corbin et al.</i>	<i>Ren et al.</i>	<i>Corbin et al.</i>	<i>Ren et al.</i>
AGS	44,2 ± 3,3	4,3 ± 7,9	23,6 ± 4,6	4,5 ± 2,2
AGI	55,8 ± 3,3	95,7 ± 7,9	76,4 ± 4,6	95,5 ± 2,2
AGMI	35,1 ± 7,7	60,2 ± 4,0	46,8 ± 10,8	58,5 ± 1,1
AGPI	20,7 ± 4,3	35,4 ± 3,9	29,6 ± 6,2	36,9 ± 1,1
	Emulsion à 15%		Emulsion à 20%	
	<i>Corbin et al.</i>	<i>Ren et al.</i>	<i>Corbin et al.</i>	<i>Ren et al.</i>
AGS	24,0 ± 4,6	7,6 ± 4,6	28,8 ± 4,3	2,2 ± 1,5
AGI	76,0 ± 4,6	92,4 ± 4,6	71,2 ± 4,3	97,8 ± 1,5
AGMI	49,4 ± 10,1	60,1 ± 2,3	44,6 ± 9,9	61,2 ± 0,7
AGPI	26,6 ± 5,6	32,3 ± 2,3	26,6 ± 5,6	36,6 ± 0,7
	Emulsion à 30%		Emulsion à 40%	
	<i>Corbin et al.</i>	<i>Ren et al.</i>	<i>Corbin et al.</i>	<i>Ren et al.</i>
AGS	32,1 ± 4,1	2,2 ± 2,9	18,0 ± 4,9	1,9 ± 1,5
AGI	67,9 ± 4,1	97,8 ± 2,9	82,0 ± 4,9	98,1 ± 1,5
AGMI	43,0 ± 9,3	61,9 ± 1,5	51,2 ± 11,4	61,2 ± 0,8
AGPI	24,9 ± 5,2	35,9 ± 1,4	30,8 ± 6,5	36,9 ± 0,7

TABEAU 4.7 – Résultats (en %) des calculs de quantification de la composition en AG des émulsions, de 5% à 40% de fraction lipidique, avec les algorithmes de *Corbin et al.* et *Ren et al.*.

Les résultats des calculs de quantification de la composition lipidique effectués sur chaque émulsion avec les deux algorithmes considérés sont présentés dans le tableau 4.7. Pour chacune des fractions calculées, les résultats sont présentés sous la forme "valeur ± erreur". L'erreur est dérivée des valeurs de CRLB relevées pour les résonances utilisées dans le calcul de la fraction d'AG. De manière générale, l'algorithme de *Ren et al.* obtient de meilleurs résultats que celui de *Corbin et al.* d'après les valeurs théoriques attendues pour l'huile de colza (tableau 4.1). En effet, les résultats issus de l'algorithme de *Corbin et al.* présentent une fraction d'AGPI proche de la valeur attendue (moyenne de $26,5 \pm 3,6\%$ pour 30%), mais des valeurs erronées pour les autres fractions : les AGI sont sous-estimés de 20% en moyenne (valeur moyenne de $71,6 \pm 9,1\%$ pour 92%) entraînant une sous-estimation des AGMI d'autant (moyenne de $45,0 \pm 5,7\%$ pour 62%) et une surestimation des AGS (moyenne de $28,4 \pm 9,1\%$ pour 8%). L'algorithme de *Ren et al.* produit une

légère surestimation de 5% de la fraction d'AGPI (moyenne $35,7 \pm 1,8\%$ pour 30%) ainsi que de la fraction d'AGI (moyenne de $96,2 \pm 2,2\%$ pour 92%), ceci provoque une sous-estimation équivalente de la fraction d'AGS (moyenne de $3,8 \pm 2,2\%$ pour 8%), cependant l'erreur est amoindrie sur la fraction d'AGMI où la sous-estimation induite est très faible (moyenne de $60,5 \pm 1,2\%$ pour 62%).

Discussion

De même que pour l'évaluation des algorithmes de *Corbin et al.* et *Ren et al.* sur les objets-tests d'huile pure, les résultats obtenus sur les objets-test préparés à partir d'émulsions mettent en évidence que l'algorithme de *Ren et al.* est le plus approprié, pour la quantification de la composition lipidique, dans nos conditions expérimentales. Encore une fois, l'algorithme de *Corbin et al.* donne une valeur proche de la théorie pour la fraction d'AGPI uniquement. Cependant, lors de la revue de la littérature, il a été observé que ces deux algorithmes ont été utilisés *in vivo* dans des conditions différentes. En effet, celui de *Corbin et al.* est utilisé dans des problématiques de quantification des lipides hépatiques [63, 69, 70], application pour laquelle il a été proposé au départ [20], tandis que celui de *Ren et al.* est utilisé pour la composition des lipides des tissus adipeux [89, 93–95], là encore application pour laquelle il a été proposé à l'origine [19]. Il est donc apparu important de comparer ces deux algorithmes dans le cas de la quantification des lipides hépatiques et mammaires (représentant le cas d'un tissu adipeux).

Pour conclure sur les résultats obtenus lors des études de validation des algorithmes sur des objets-tests, l'algorithme de *Zancanaro et al.* a été éliminé, et l'algorithme de *Ren et al.* semble le plus approprié à la quantification de la composition en AG. Par la suite, des validations *in vivo* ont été réalisées. Les algorithmes de *Corbin et al.* et *Ren et al.* ont été appliqués sur des données acquises *in vivo* au niveau hépatique, dans le cadre d'une étude pré-clinique sur la souris à 4,7 T puis d'une étude clinique chez des patients à 3,0 T. Les deux algorithmes de quantification des AG ont également été testés sur du tissu mammaire, dans le cadre d'une étude clinique à 3,0 T. Les deux parties suivantes de ce chapitre présentent les tests effectués et les résultats obtenus.

4.3 Validation *in vivo* des algorithmes pour la quantification des lipides hépatiques

4.3.1 Etude pré-clinique sur modèles murins

Animaux

Six souris femelles obèses (ob/ob, c57BL/6JRj), âgées de cinq semaines (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) ont été utilisées pour évaluer les algorithmes de quantification des AG hépatiques dans le cas d'une forte infiltration lipidique. Ces animaux ont initialement été utilisés dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Bernard FROMENTY (Unité Foie, Métabolisme, Cancer ; INSERM UMR991) sur l'étude des effets hépatiques du paracétamol chez des populations obèses présentant une stéatose. Notre étude méthodologique sur l'évaluation des algorithmes de quantification de la composition en AG des lipides hépatiques a été réalisée parallèlement, en profitant de ces données *in vivo*, en utilisant uniquement les acquisitions effectuées sur les souris obèses. L'anesthésie a été réalisée par injection intra-péritonéale d'un mélange de kétamine (55 mg/kg) et de xylazine (5,5 mg/kg). Trois acquisitions ont été effectuées sur chacune de ces souris (jour 0, 14 et 28).

Une acquisition supplémentaire a été réalisée sur une souris femelle contrôle (*wild type*, c57BL/6JRj. Animalerie centrale ARCHE Biosit, Campus Villejean, Université de Rennes 1). L'anesthésie a été induite par voie gazeuse en utilisant de l'isoflurane (induction à 3%, maintien à 1,5%). Le choix d'une anesthésie gazeuse a été motivée par le souhait d'obtenir une fréquence respiratoire de l'animal plus basse que lors d'une anesthésie fixe par un mélange de kétamine et xylazine, ceci dans le but d'effectuer des acquisitions d'évaluation de la mesure du T_1 présentée dans le chapitre 5 de ce manuscrit.

Toutes les expérimentations sur ces animaux ont été approuvées par le comité local d'éthique animale.

Protocole d'acquisition

Les acquisitions ont été réalisées avec la même installation que pour les objets-tests d'huiles pures (*cf* §4.2.1 page 99). Les acquisitions de SRM ont été synchronisées avec la respiration de l'animal par l'intermédiaire d'un capteur pneumatique placé au niveau de l'abdomen de la souris, et relié à la station d'acquisition par

fibre optique.

Pour le positionnement du voxel, des images anatomiques RARE multi-coupes pondérées en T_1 (RARE : *Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement* [74] en anglais) ont été acquises avec les paramètres suivants (durée de l'acquisition = 2 min) :

- $TR = 900$ ms ;
- $TE = 11,7$ ms ;
- nombre de coupes = 20 ;
- épaisseur de coupe = 1 mm ;
- champ de vue = 5×5 cm² ;
- matrice = 192x192 ;
- nombre d'accumulations = 3.

Le voxel d'intérêt a été placé dans le lobe droit du foie de chaque animal, de façon à avoir une zone de tissu la plus homogène possible, pour l'acquisition du signal SRM en utilisant une séquence PRESS et les paramètres suivants (durée de l'acquisition ≈ 11 min) :

- $TR = 2500$ ms ;
- $TE = 11$ ms ;
- nombre d'accumulations = 256 ;
- nombre de "dummy scans" = 4.

Suite aux résultats présentés dans le chapitre 3, aucune suppression du signal de l'eau n'a été appliquée.

Les spectres ont tous été traités à l'aide du logiciel *LCModel* sans introduction de connaissances *a priori* et la base simulée "Liver-8".

Parmi les 18 spectres acquis, seuls les 14 dont les valeurs de CRLB relevées pour les résonances d'intérêt étaient inférieures à 10% (*cf* §3.2.2 page 68) ont été exploités.

Résultats

Un exemple de spectre obtenu sur une souris obèse est présenté sur la figure 4.6. Chacune des résonances associées aux lipides est indiquée par une flèche ainsi que sa nomenclature issue de *LCModel*. La largeur à mi-hauteur de la résonance de l'eau de ce spectre est de 53,8 Hz, ce qui est représentatif de l'ensemble du groupe de spectres de SRM acquis sur les souris obèses de notre étude (FWHM moyenne de $53,7 \pm 4,8$ Hz), dont les résonances d'intérêt respectent le critère de validité $CRLB < 10\%$ ($n=14$). La résolution spectrale de nos spectres est en accord avec celle observée dans la littérature pour des études *in vivo* chez le petit animal,

en particulier pour des études sur le foie de souris à 4,7 T [20]. Les résonances d'intérêt pour la quantification de la composition lipidique (*Lip09*, *Lip21*, *Lip23*) sont, à l'exception de quelques spectres, quantifiées de manière suffisamment précise pour l'application des algorithmes de quantification ($CRLB < 10\%$), même si les résonances *Lip21* et *Lip23*, très proches l'une de l'autre, semblent difficilement dissociables visuellement. En revanche, la résonance *Lip28*, d'importance majeure pour la distinction des AGPI et AGMI, n'est pas du tout visible sur le spectre, ni quantifiée par LCModel.

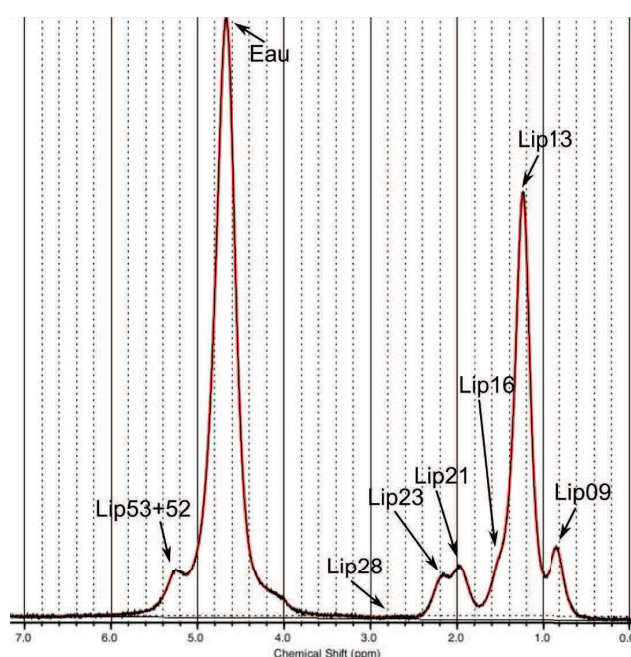


FIGURE 4.6 – Spectre de SRM acquis à 4,7 T dans le foie d'une souris obèse dont la fraction lipidique est de 34,8% présentant une FWHM de 53,8 Hz.

La fraction lipidique moyenne mesurée sur ce groupe de souris ($n=14$) est de $28,6 \pm 4,1\%$. La quantification de la composition des lipides hépatiques à partir des spectres de ces souris n'a pu être réalisée dans le détail en raison de l'impossibilité de quantifier la résonance *Lip28* permettant le calcul de la fraction d'AGPI. En effet, cette fraction est la première calculée, en parallèle avec la fraction d'AGI, par chacun des deux algorithmes considérés. A partir de ces deux mesures, la fraction d'AGMI est déduite. En l'absence de l'information issue de cette résonance, seule la distinction entre AGS et AGI est réalisable. Les deux algorithmes ont été évalués sur quatorze des dix-huit spectres acquis lors de l'étude. Les quatre spectres éliminés l'ont été car ne répondant pas au critère de qualité de la quantification

des résonances d'intérêt (*Lip09*, *Lip21* et *Lip23*), à savoir $\text{CRLB} < 10\%$.

L'algorithme de *Corbin et al.* donne des valeurs moyennes d'AGS et d'AGI de $31,4 \pm 4,1\%$ et $68,6 \pm 4,1\%$, respectivement. Les résultats issus de l'algorithme de *Ren et al.* sont très variables d'une souris à l'autre. Une forte surestimation de la fraction d'AGI entraîne une valeur supérieure à 100%, dans le cas de quatre des quatorze spectres utilisés, d'où une fraction d'AGS négative. Les valeurs moyennes obtenues pour les fractions d'AGS et AGI sont donc égales à $0,7 \pm 18,2\%$ et $99,3 \pm 18,2\%$, respectivement.

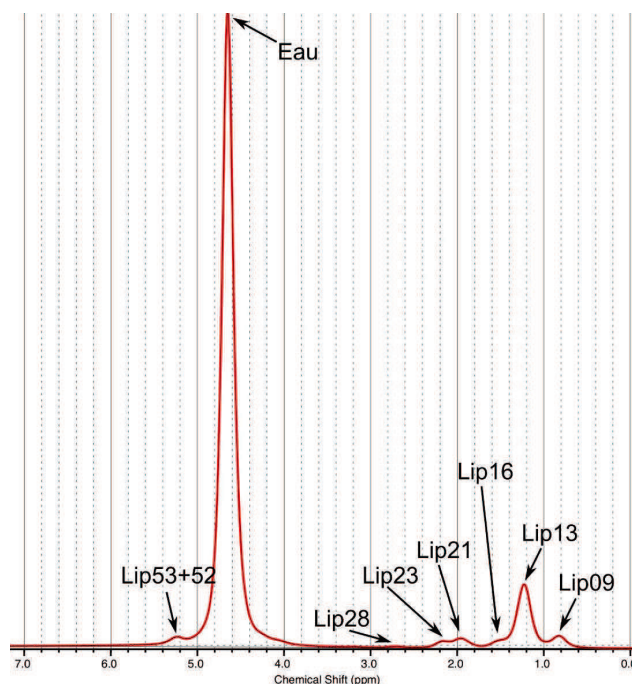


FIGURE 4.7 – Spectre de SRM acquis à 4,7 T dans le foie d'une souris contrôle dont la fraction lipidique est de 10,0% présentant une FWHM de 33,4 Hz.

Le spectre obtenu lors de l'acquisition de SRM sur le foie de la souris contrôle (ou *wild type*) est présenté sur la figure 4.7 où les résonances sont indiquées par des flèches, ainsi que leurs nomenclatures *LCModel*. En comparaison avec le spectre de la figure 4.6, les résonances associées aux lipides ont une amplitude réduite, ce qui est en accord avec la différence de fraction lipidique mesurée : 34,8% et 10,0% pour la souris obèse et la souris contrôle, respectivement. La plus faible quantité de lipides chez la souris contrôle a permis l'obtention d'une FWHM beaucoup plus fine (33,4 Hz contre une moyenne de $53,7 \pm 4,8$ Hz chez les souris obèses). Dans le cas de ce spectre, toutes les résonances d'intérêt pour les calculs de composition lipidique, suivant les deux algorithmes, ont été quantifiées de manière suffisamment précise ($\text{CRLB} < 10\%$) pour le calcul détaillé de la composition en AG. Les résultats

obtenus sont présentés dans le tableau 4.8. Pour les fractions d'AGS, AGI et AGMI, les deux algorithmes ont donné des résultats très différents. Par exemple, la fraction d'AGI est fortement sur-estimée par l'algorithme de *Ren et al.* avec une valeur dépassant les 100% ; l'algorithme de *Corbin et al.*, lui, obtient une valeur d'AGI de $65,6 \pm 4,6\%$. En revanche, les fractions d'AGPI calculées par les deux algorithmes sont plus cohérentes.

	<i>Corbin et al.</i>	<i>Ren et al.</i>
AGS	$34,4 \pm 4,6$	$-5,1 \pm 5,3$
AGI	$65,6 \pm 4,6$	$105,1 \pm 5,3$
AGMI	$53,0 \pm 10,3$	$84,8 \pm 2,7$
AGPI	$12,6 \pm 5,7$	$20,2 \pm 2,6$

TABLEAU 4.8 – *Résultats (en %) des calculs de quantification de la composition en AG dans le foie de la souris contrôle, avec les algorithmes de Corbin et al. et Ren et al.. Pour chacune des fractions calculées, les résultats sont présentés sous la forme "valeur \pm erreur". L'erreur est dérivée des valeurs de CRLB relevées pour les résonances utilisées dans le calcul de la fraction d'AG.*

Discussion

De manière générale, l'algorithme de *Corbin et al.* semble obtenir des résultats plus appropriés pour la quantification de la composition des lipides hépatiques chez la souris *in vivo*, en comparaison avec l'algorithme de *Ren et al.* ayant présenté de nombreuses valeurs incohérentes, et ce malgré une quantification précise des résonances d'intérêt par *LCModel* (CRLB<10%). Dans notre étude sur les souris obèses, il a été impossible d'obtenir la valeur de la fraction d'AGPI (et donc d'AGMI) en raison de l'absence de quantification robuste de la résonance *Lip28* par le logiciel utilisé (*LCModel*). Une hypothèse porte sur la très faible quantité d'acides gras poly-insaturés dans les lipides hépatiques de ce type de souris, à hauteur de 9,2% d'après une étude effectuée *ex vivo* par chromatographie en phase gazeuse [61]. Cependant, cela ne semble pas en accord avec les valeurs publiées par une étude proposant la quantification des AG hépatiques par SRM, à 9,4 T, chez la souris obèse (ob/ob) [15], mettant en évidence une fraction d'AGPI de $24,8 \pm 4,2\%$. D'autre part, la valeur des fractions d'AGS et d'AGI issues de cet article, utilisant l'algorithme de *Corbin et al.*, sont de $10,0 \pm 3,8\%$ et $90,0 \pm 3,8\%$, respectivement. Les valeurs de notre étude, issues du même algorithme, ne concordent pas, alors que l'algorithme de *Ren et al.*, si on élimine les données incohérentes, produit des résultats similaires. En revanche, la quantification produite par l'algorithme

de *Corbin et al.* correspond aux valeurs obtenues par chromatographie en phase gazeuse [61]. N'ayant pas trouvé d'autres résultats concernant la composition des lipides hépatiques chez ce type de souris, il semble difficile de conclure en faveur d'un algorithme ou de l'autre, cependant il est important de noter que l'algorithme de *Ren et al.* paraît moins robuste. S'agissant de la quantification de la composition des lipides hépatiques chez la souris contrôle, aucune étude de SRM n'a été trouvée dans la littérature. Ceci est sans doute dû aux très faibles fractions lipidiques généralement obtenues sur ces souris. En effet, les fractions lipidiques chez les souris non obèses sont généralement très inférieures à 5%. Les différentes résonances sont alors peu visibles et difficilement quantifiables. La souris utilisée dans cette étude présentant une quantité de lipide de l'ordre de 10%, il a donc été possible d'effectuer les calculs de quantification de la composition lipidique, et d'en obtenir une version détaillée. Les résultats de l'algorithme de *Ren et al.* sont inexploitable, mais ceux provenant de l'utilisation de l'algorithme de *Corbin et al.* sont comparables aux valeurs exposées dans différents travaux réalisés par chromatographie en phase gazeuse [61–63], donc *ex vivo*.

A l'issue de cette étude de validation *in vivo* sur modèle murin, il apparaît que l'algorithme de *Corbin et al.* est le plus robuste pour la quantification des lipides hépatiques. De plus, nos résultats obtenus pour la quantification des différents types d'AG avec cet algorithme sont comparables aux divers résultats publiés par des études réalisées *ex vivo* effectuant la quantification des AG à partir d'autres modalités que la SRM.

4.3.2 Etude clinique

Une collaboration avec le professeur Yves GANDON, du département de Radiologie du CHU de Rennes, et le docteur Elise BANNIER, de l'équipe VisAGeS (*Vision, Action and information manaGement System in health*) INSERM U746 à Rennes, a permis d'obtenir des acquisitions de SRM au niveau hépatique dans un cadre clinique. Cette collaboration nous a donné l'opportunité d'évaluer les algorithmes de quantification de la composition des lipides hépatiques dans le cas d'une expérimentation réalisée dans des conditions cliniques afin de vérifier les conclusions précédentes, obtenues dans le cadre d'une étude pré-clinique.

Patients

Onze patients, âgés de 49 ± 12 ans et suspectés de présenter une stéatose hépatique ont été inclus dans l'étude.

Toutes les expérimentations sur ces patients ont été approuvées par le comité d'examen institutionnel.

Protocole d'acquisition

Il est à noter que, ces acquisitions ayant été réalisées dans le cadre d'un suivi clinique des patients, le protocole utilisé n'a pu être modifié pour notre étude méthodologique.

Les acquisitions ont été réalisées à 3,0 T avec un spectromètre imageur clinique (Verio, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Allemagne) équipé d'une bobine RF thorax à 32 canaux pour la réception. Pour le positionnement du voxel des images anatomiques HASTE multi-coupes pondérées en T_2 (HASTE : *Half-Fourier Acquisition Single-shot Turbo Spin Echo* [75] en anglais) ont été acquises avec les paramètres suivants (durée de l'acquisition = 2 min) :

- $TR = 1000$ ms ;
- $TE = 96$ ms ;
- nombre de coupes = 30 ;
- épaisseur de coupe = 5 mm ;
- champ de vue = 38×28 cm² ;
- résolution spatiale = $1,5 \times 1,2$ mm² ;
- nombre d'accumulations = 1.

Un spectre de SRM a été acquis dans un voxel d'intérêt de $30 \times 30 \times 30$ mm³ placé dans le lobe droit du foie de chaque patient avec une séquence STEAM (*cf* §1.2.1 du chapitre 1) avec les paramètres d'acquisition suivants (durée de l'acquisition = 10 s) :

- $TR = 4000$ ms ;
- $TE = 20$ ms ;
- nombre d'accumulations = 2.

Chaque acquisition a été effectuée lors d'une apnée du patient. Suite aux résultats présentés dans le chapitre 3, aucune suppression du signal de l'eau n'a été appliquée.

Tous les spectres ont été traités avec le logiciel *LCModel* sans introduction de connaissance *a priori* et l'utilisation de la base simulée "Liver-8". Les calculs de quantification de la composition des lipides hépatiques ont ensuite été effectués, en

utilisant les algorithmes de *Corbin et al.* et *Ren et al.*, sur les spectres le permettant (CRLB < 10% pour les résonance lipidiques d'intérêt).

Résultats

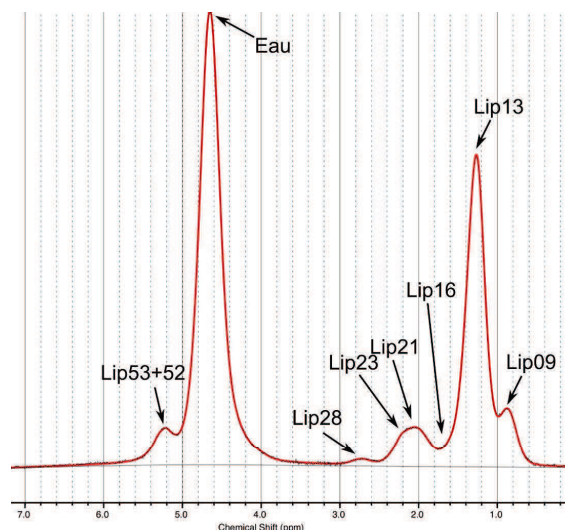


FIGURE 4.8 – Spectre de SRM acquis à 3,0 T dans le foie d'un patient, dont la fraction lipidique est de 35,6%, présentant une FWHM de 36,2 Hz.

Sur les onze patients de cette étude, pour lesquels une stéatose a été suspectée, neuf sont en effet atteints de stéatose (fraction lipidique > 5%). La fraction lipidique moyenne observée est de $15,3 \pm 10,8\%$ ($n=11$). Deux groupes se démarquent, avec cinq patients présentant une fraction lipidique supérieure à 20% et six patients dont la fraction lipidique est inférieure à 15% (dont deux sont inférieures à 5%). La quantification complète de la composition des lipides hépatiques n'a été possible que pour un seul de ces patients, présentant la fraction lipidique la plus élevée (35,6%) et dont le spectre est présenté sur la figure 4.8 (FWHM = 36,2 Hz). Une quantification des fractions d'AGS et d'AGI a pu être effectuée pour deux patients supplémentaires, faisant partie du groupe dont les fractions lipidiques sont les plus élevées (FWHM de 28,2 Hz et 32,5 Hz). Pour les deux patients restants de ce groupe, les spectres obtenus n'ont pas permis la quantification des diverses résonances en raison d'une FWHM très élevée (57,4 Hz et 76,8 Hz) sans doute en raison d'un mouvement du patient au moment de l'acquisition. Enfin, malgré une qualité spectrale correcte (valeur moyenne de FWHM de $32,5 \pm 9,5$ Hz), les spectres acquis chez les six patients présentant une fraction lipidique plus faible (< 15%) n'ont pu être exploités pour le calcul de la composition lipidique car le critère de précision de la quantification des résonances d'intérêt (*Lip21*, *Lip23*,

Lip28) par le logiciel *LCModel* n'était pas respecté.

	<i>Corbin et al.</i>	<i>Ren et al.</i>
AGS	$34,9 \pm 6,5$	$-19,7 \pm 8,3$
AGI	$65,1 \pm 6,5$	$119,7 \pm 8,3$
AGMI	$49,1 \pm 8,6$	$90,3 \pm 4,2$
AGPI	$16,0 \pm 2,1$	$29,4 \pm 4,1$

TABLEAU 4.9 – *Résultats (en %) des calculs de quantification de la composition des lipides hépatiques d'un patient présentant une FL de 35,6% (FWHM = 36,6 Hz), avec les algorithmes de Corbin et al. et Ren et al.. Pour chacune des fractions calculées, les résultats sont présentés sous la forme "valeur \pm erreur". L'erreur est dérivée des valeurs de CRLB relevées pour les résonances utilisées dans le calcul de la fraction d'AG.*

Les valeurs moyennes d'AGS et AGI obtenues, à partir des trois spectres permettant leur quantification, en utilisant l'algorithme de *Corbin et al.* sont égales à $40,8 \pm 5,3\%$ et $59,2 \pm 5,3\%$, respectivement. Les valeurs moyennes issues de l'utilisation de l'algorithme de calcul de *Ren et al.* pour les fractions d'AGS et AGI sont $-11,0 \pm 8,1\%$ et $111,0 \pm 8,1\%$, respectivement.

Les résultats de la quantification complète de la composition des lipides hépatiques chez le patient dont le spectre était suffisamment résolu pour en permettre le calcul sont présentés par le tableau 4.9. Il apparaît que l'algorithme de *Corbin et al.* fournit des résultats cohérents par rapport aux résultats issus de l'algorithme de *Ren et al.*, dont une très forte surestimation de la fraction d'AGI induit une valeur supérieure à 100% pour cette dernière. De plus, les fractions d'AGPI obtenues par ces deux algorithmes ne sont pas comparables l'une avec l'autre.

Discussion

D'une part, l'algorithme de *Ren et al.* apparaît comme inadapté à la quantification de la composition des lipides hépatiques par SRM *in vivo* chez l'Homme présentant une stéatose. En effet, la très forte surestimation des AGI, pour chacun des patients considérés dans l'étude présentée, entraîne une erreur de calcul de la quantification jusqu'à obtenir des valeurs supérieures à 100% ou négatives (tableau 4.9).

D'autre part, l'algorithme de *Corbin et al.* permet d'obtenir des valeurs répondant à celles observées dans la littérature [60] à partir d'analyses *ex vivo* par chromatographie en phase gazeuse. En effet, dans le cas de patients atteints de stéatose hépatique, les fractions d'AGS et AGI calculées par l'algorithme de *Corbin et*

al. dans nos conditions expérimentales ($40,8 \pm 5,3\%$ et $59,2 \pm 5,3\%$, respectivement) sont quasiment égales à celles publiées dans l'étude précédemment citée ($41,5 \pm 1,8\%$ et $58,4 \pm 5,9\%$, respectivement). En ce qui concerne les valeurs issues de la quantification de la composition en AG des lipides hépatiques sur l'unique patient pour lequel les calculs ont été possibles, la fraction d'AGPI est proche de celle de l'étude biochimique ($16,0 \pm 2,1\%$ pour $18,2 \pm 1,9\%$). En revanche la fraction d'AGI semble surestimée ($65,1 \pm 6,5\%$ pour $58,4 \pm 5,9\%$), d'où une surestimation de la fraction d'AGMI et une sous-estimation de la fraction d'AGS. Malgré cela, ces résultats restent cohérents avec ceux de *Araya et al.* [60].

Pour conclure, l'algorithme de *Corbin et al.* semble le plus adéquat pour la quantification de la composition des lipides hépatiques, par SRM *in vivo*, d'après les résultats de cette étude clinique. La seule différence entre les deux algorithmes de quantification testés est la résonance utilisée comme référence, *Lip09* ou *Lip23* pour *Corbin et al.* et *Ren et al.*, respectivement. En observant le spectre acquis sur un patient ayant une forte fraction lipidique hépatique (figure 4.8), on remarque que les résonances *Lip21* et *Lip23*, très proches l'une de l'autre, ne sont pas dissociables visuellement. Il paraît donc logique que les calculs de la fraction d'AGI par l'algorithme de *Ren et al.* utilisant ces deux résonances produisent des résultats incohérents.

4.4 Validation *in vivo* des algorithmes pour la quantification des lipides mammaires

Dans le cadre d'une collaboration avec le professeur Philippe BOUGNOUX et le docteur Lobna OULDAMER, de l'équipe INSERM UMR 1069 du CHRU de Tours, ainsi que le docteur Laurent BARANTIN, de l'équipe INSERM U930 de l'université François-Rabelais de Tours, des spectres de SRM acquis *in vivo* dans le sein de patientes ont permis l'évaluation des algorithmes de quantification de la composition des lipides du tissu mammaire.

Cette étude a donné lieu à une note acceptée par le journal scientifique "*Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medecine*", (Annexe B).

4.4.1 Patientes

Vingt-cinq patientes (âge = $58,8 \pm 12,7$ ans, IMC = $27,4 \pm 6,1$ kg/m²), pour lesquelles un examen d'IRM a été prescrit suite au diagnostic d'un cancer du sein, ont été incluses dans cette étude.

Toutes les expérimentations sur ces patientes ont été approuvées par le comité d'examen institutionnel.

4.4.2 Protocole d'acquisition

De même que dans le cas de l'étude clinique effectuée au niveau du tissu hépatique, ces acquisitions ayant été réalisées dans le cadre d'un suivi clinique des patientes, le protocole utilisé n'a pu être modifié pour notre étude méthodologique.

Les acquisitions ont été réalisées en utilisant un spectromètre imageur à 3,0 T (Verio, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Allemagne) avec une bobine RF spécifique à 16 canaux dédiée à l'IRM de la poitrine (*16-channel AI breast coil*).

Pour le positionnement du voxel, des images anatomiques ont été acquises avec une séquence TSE (pour *Turbo Spin Echo* en anglais) multi-coupes, pondérée en T_1 utilisant les paramètres suivants (durée de l'acquisition = 1 min 10 s) :

- $TR = 710$ ms ;
- $TE = 7,2$ ms ;
- nombre de coupes = 90 ;
- épaisseur de coupe = 2 mm ;
- champ de vue = 32×32 cm² ;
- matrice = 384×384 ;
- nombre d'accumulations = 2 ;
- facteur d'accélération = 8.

Les spectres ont été acquis avec la séquence STEAM, dans un voxel d'intérêt de $15 \times 15 \times 15$ mm³ positionné dans du tissu mammaire sain, dans le sein contro-latéral à celui présentant une tumeur. L'utilisation de la suppression du signal de l'eau n'a pas été nécessaire puisque le voxel d'intérêt a été placé dans du tissu adipeux. Pour chacune des patientes, les paramètres d'acquisition ont été les suivants (durée de l'acquisition = 3 min) :

- $TR = 2000$ ms ;
- $TE = 20$ ms ;
- $TM = 10$ ms ;

— nombre d'accumulations = 92.

Tous les spectres ont été traités avec le logiciel *LCModel*, sans introduction de connaissance *a priori* et l'utilisation de la base simulée "Breast-8". Cependant, pour quantifier les résonances associées aux lipides présents sur un spectre, *LCModel* a besoin, en entrée, d'un spectre dont la fenêtre spectrale est centrée sur la résonance de l'eau. Or, pour la majorité des données acquises lors de cette étude, en raison de la très faible quantité d'eau dans les volumes d'intérêt, nous avons obtenus des spectres centrés sur la résonance majeure des lipides, à savoir *Lip13*. Pour ces spectres, un pré-traitement via un programme que j'ai développé sous l'environnement *Matlab* (Version 8.1, Matworks, Natick, MA, USA) a été nécessaire dans le but de recentrer le spectre autour de la résonance de l'eau.

4.4.3 Résultats

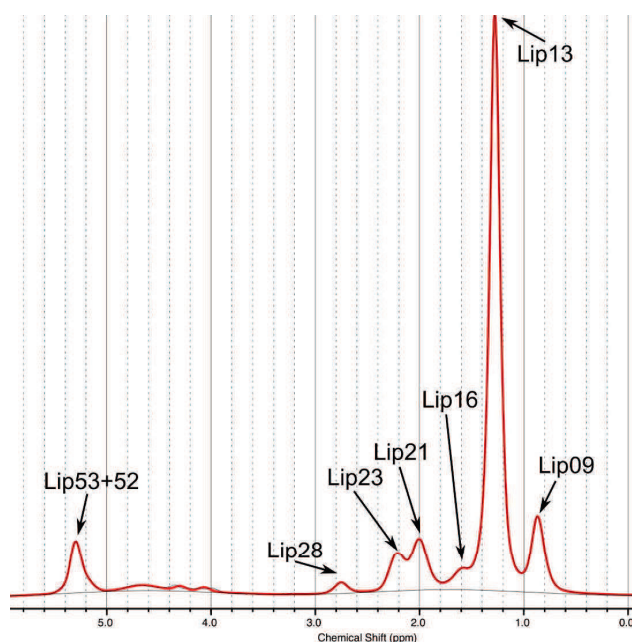


FIGURE 4.9 – Spectre de SRM acquis à 3,0 T dans le sein d'une patiente (tissu mammaire sain du sein contro-latéral à celui présentant une tumeur), présentant une FWHM de 14,5 Hz.

La figure 4.9 présente un exemple de spectre de SRM acquis *in vivo*, à 3,0 T, dans un volume d'intérêt placé dans du tissu mammaire sain d'une patiente (dans le sein contro-latéral à celui présentant une tumeur). Les résonances associées aux lipides sont identifiées par des flèches et la nomenclature *LCModel* correspondante est précisée. On peut remarquer une excellente résolution spectrale dans ces conditions expérimentales, et la possible dissociation de toutes les résonances d'intérêt

(*Lip09*, *Lip21*, *Lip23* et *Lip28*) pour la quantification des proportions des différents types d'AG par les deux algorithmes de quantification étudiés (*Ren et al.* et *Corbin et al.*).

La résolution spectrale, obtenue pour vingt-trois des vingt-cinq spectres, a permis la quantification précise (CRLB < 10%) de toutes les résonances d'intérêt (*Lip09*, *Lip21*, *Lip23* et *Lip28*) pour le calcul de la quantification de la composition complète des lipides mammaires suivant les deux algorithmes considérés, pour chacune des patientes. Les deux spectres non utilisés ont été éliminés de notre étude car la résonance *Lip28* n'était pas suffisamment bien quantifiée (CRLB = 16%) pour l'un, et un mouvement de la patiente au moment de l'acquisition a rendu le spectre inexploitable pour l'autre. Les valeurs moyennes obtenues pour les fractions d'AGS, AGI, AGMI et AGPI sont présentées dans le tableau 4.10. Les fractions d'AGPI mesurées par chacun des algorithmes sont relativement proches l'une de l'autre, cependant une grande différence est observée pour la fraction d'AGI, induisant donc une différence du même ordre pour les fractions d'AGS et AGMI. Enfin, les gammes de valeurs observées pour les fractions d'AGS, AGI, AGMI et AGPI ont été de $23,8 \pm 7,1\%$, $76,2 \pm 7,1\%$, $55,4 \pm 6,8\%$ et $20,8 \pm 4,4\%$, respectivement.

	<i>Corbin et al.</i>	<i>Ren et al.</i>
AGS	$40,2 \pm 12,3$	$23,8 \pm 7,1$
AGI	$59,8 \pm 12,7$	$76,2 \pm 7,1$
AGMI	$43,6 \pm 10,3$	$55,4 \pm 6,8$
AGPI	$16,2 \pm 4,4$	$20,8 \pm 4,4$

TABLEAU 4.10 – Résultats (en %) des calculs de quantification de la composition des lipides dans le tissu mammaire sain de patientes (valeurs moyennes, $n=23$) à 3,0 T, avec les algorithmes de *Corbin et al.* et *Ren et al.*.

4.4.4 Discussion

Les valeurs moyennes des fractions d'AGS, AGI, AGMI et AGPI observées, en utilisant l'algorithme de calcul de *Ren et al.*, pour les données des travaux présentés (tableau 4.9), sont en accord avec celles obtenues dans deux études précédentes (tableau 4.11) utilisant des spectromètres imageurs de 7,0 T [94, 95], qui sont rarement utilisés en routine clinique. Les valeurs obtenues avec l'algorithme de *Corbin et al.* ne sont pas comparables à celles publiées dans les deux études citées pré-

cédemment. Il apparaît donc que l'algorithme de *Ren et al.* est le plus approprié aux calculs de quantification de la composition des lipides du tissu mammaire, et par extension aux calculs de quantification de la composition des lipides des tissus adipeux.

	<i>Dimitrov et al.</i> [94]	<i>Graaf et al.</i> [95]
AGS	$28,7 \pm 8,4$	$27,0 \pm 8,7$
AGI	$71,3 \pm 8,4$	$73,0 \pm 8,7$
AGMI	$48,5 \pm 7,9$	$51,2 \pm 8,4$
AGPI	$22,7 \pm 3,1$	$21,8 \pm 9,8$

TABLEAU 4.11 – *Résultats (en %) des calculs de quantification de la composition en AG dans le tissu mammaire sain de patientes à 7,0 T [94, 95], avec l'algorithme de Ren et al..*

De plus, cette étude a permis de montrer qu'il est possible de quantifier la composition des lipides du tissu mammaire en détail de manière non-invasive, *in vivo*, par SRM, dans des conditions cliniques (3,0 T), et d'obtenir les mêmes résultats qu'à plus haut champ (7,0 T). Il est alors envisageable d'effectuer ce type d'acquisition et de quantification dans des études cliniques, ou lors du suivi d'une patiente, en utilisant la composition en AG des lipides du tissu mammaire comme un biomarqueur de l'apport alimentaire dans le but de la prévention du cancer du sein [104]. En effet, un intérêt grandissant est porté au lien existant entre le cancer du sein et la nutrition. Des études ont montré que le profil de la composition en AG du tissu adipeux mammaire, évalué à partir d'une biopsie, pourrait être un biomarqueur utile des habitudes alimentaires [104–106]. Cependant ces résultats sont issus d'études réalisées après prélèvement de biopsie, par des méthodes invasives et longues. Des travaux commencent à s'intéresser à la détection des AGPI de manière non-invasive par SRM, cependant les séquences utilisées ne sont pas systématiquement disponibles nativement sur les imageurs cliniques, comme la séquence de corrélation spectroscopique 2D L-COSY (*Localized COrrrelated SpectroscopY* [107] en anglais), ou la séquence Sel-MQC (*Selective Multiple-Quantum Coherence transfer* [108] en anglais) ; d'autant plus que les acquisitions faites par la dernière séquence citée ne permettent pas une quantification des AGPI, mais uniquement leur détection.

4.5 Conclusion

Au cours de ce chapitre, les algorithmes de quantification de la composition en AG des lipides de *Corbin et al.*, *Ren et al.* et *Zancanaro et al.* ont été évalués dans le cadre d'études préliminaires sur objets-tests (huiles et émulsions), puis *in vivo* au niveau hépatique (pré-clinique et clinique) et mammaire (clinique). Une synthèse des résultats obtenus est présentée par le tableau 4.12.

Dès les tests sur les différentes huiles, il a été conclu qu'aucune correction, en T_1 et T_2 , n'est nécessaire, et que l'algorithme de *Zancanaro et al.* n'est pas approprié. En effet, ce dernier utilise la résonance *Lip53+52* pour la mesure de la fraction d'AGI, or cette résonance est associée à un groupement chimique qui peut être présent deux (voire trois) fois dans un même AG ; d'où une forte surestimation de cette fraction par cet algorithme.

Par l'étude sur les émulsions, l'algorithme de *Ren et al.* est apparu comme le plus adapté pour la quantification de la composition des lipides. Cependant, les deux algorithmes ont été utilisés pour la suite des études *in vivo* car toutes deux citées dans la littérature, pour des applications différentes (tissu adipeux, moelle osseuse, tissu hépatique).

Lors des études *in vivo*, le constat a été que chaque algorithme est adapté à l'une des applications testées. En effet, l'algorithme de *Corbin et al.* obtient d'excellents résultats pour la quantification de la composition des lipides hépatiques, en pré-clinique comme en clinique, tandis que l'algorithme de *Ren et al.* est plus adapté à la quantification de la composition des lipides mammaires (ou du tissu adipeux). Le fait que l'algorithme de *Ren et al.* ne soit pas utilisable au niveau hépatique peut être expliqué par la qualité spectrale amoindrie, par rapport à celle observée dans du tissu adipeux, en raison de l'inhomogénéité du tissu ainsi que du mouvement. De fait, les résonances *Lip21* et *Lip23* ne sont pas suffisamment dissociées (figures 4.6, 4.8 et 4.9) pour être utilisées ensembles pour le calcul de la fraction d'AGI qui est donc erroné. En revanche, il n'est pas aisé d'envisager une telle explication lorsqu'il s'agit de la quantification de la composition des lipides du tissu mammaire. Les résonances *Lip09* et *Lip21*, utilisées pour le calcul de la fraction d'AGI, sont quantifiées de manière précise et bien dissociées l'une de l'autre. Cependant, les valeurs de référence dans la littérature pour ces tissus sont issues de l'algorithme de *Ren et al.* Il apparaît donc logique que les résultats obtenus avec ce même algorithme dans nos conditions expérimentales concordent.

		Corbin <i>et al.</i> [20]	Ren <i>et al.</i> [19]	Zancanaro <i>et al.</i> [16]	Yeung <i>et al.</i> [17]	Strobel <i>et al.</i> [18]
Résonances utilisées	Référence	<i>Lip09</i>	<i>Lip23</i>	<i>Lip09</i>	<i>Lip23</i>	<i>Lip23</i>
	Calcul des AGI	<i>Lip21</i>	<i>Lip21</i>	<i>Lip53+52</i>	AGMI+AGPI	<i>Lip21</i>
	Calcul des AGPI	<i>Lip28</i>	<i>Lip28</i>	<i>Lip28</i>	<i>Lip28</i>	Pas de calcul
Huiles (Tournesol, Colza, noix, olive)	Correction en T_1	Non pertinent en raison du long TR utilisé pour les acquisitions			<i>Algorithmes non testés car l'utilisation de la résonance associée aux ω_3 n'est pas utilisable ici (Yeung et al.), et la méthode de Strobel et al. est similaire à la méthode de Ren et al. avec moins de détail.</i>	
	Correction en T_2	Aucun effet observé.				
	Composition en AG	Seule la fraction d'AGPI est correctement quantifiée.	Résultats de quantification cohérents pour toutes les fractions d'AG.	Résultats de quantification incohérents avec l'obtention de valeurs négatives.		
Emulsions (5 % à 40 % de lipides)	Composition en AG	Seule la fraction d'AGPI est correctement quantifiée.	Résultats de quantification cohérents pour toutes les fractions d'AG.	<i>Non testés en raison des résultats obtenus sur les huiles.</i>		
Etudes <i>in vivo</i>	Tissu hépatique en pré-clinique	Algorithme robuste pour cette application.	Calculs erronés avec des valeurs négatives de fractions d'AGS.			
	Tissu hépatique en clinique					
	Tissu mammaire en clinique	Résultats de la quantification éloignés de la littérature.	Résultats de la quantification en accord avec les valeurs publiées dans la littérature.			

TABLEAU 4.12 – Synthèse des résultats obtenus au cours des travaux de tests et validations, sur objets-tests et *in vivo*, dans nos conditions expérimentales, des algorithmes de quantification de la composition en AG des lipides.

Chapitre 5

Développements pour la mesure du temps de relaxation longitudinale (T_1)

Sommaire

5.1	Mesure <i>in vivo</i> du temps de relaxation T_1	131
5.1.1	Problématique	131
5.1.2	Nouvelle méthode LOREDE	134
5.2	Modification de la séquence PRESS de Bruker	135
5.2.1	Problème rencontré avec la séquence du constructeur .	135
5.2.2	Solution proposée	137
5.3	Validation de la méthode LOREDE	141
5.3.1	Validation sur objets-tests	141
5.3.2	Validation <i>in vivo</i> sur modèle animal : étude préliminaire	144
5.4	Conclusion	147

La plus value de la SRM par rapport à l'IRM est la possibilité d'observer simultanément, tout en les dissociant les uns des autres, les signaux issus de tous les métabolites présents dans l'échantillon étudié. Dans le cas des lipides hépatiques, la contribution de chaque groupement chimique des molécules d'AG présents dans le tissu biologique est distinguée. Ceci permet la quantification de la composition en AG des lipides (*cf* chapitre 4), en plus de la mesure de la fraction lipidique (FL), utilisée pour le diagnostic d'une stéatose. Dans le but d'effectuer un diagnostic plus précis sur les causes de cette stéatose, ou pour assurer le suivi d'un patient lors d'un traitement ou d'un régime, un intérêt grandissant est porté au développement de la quantification de la composition en AG des lipides hépatiques. Différents algorithmes de quantification des AG ont été proposés ayant chacun une application précise (*cf* chapitre 4), et une harmonisation du protocole d'acquisition des spectres de SRM pour la quantification des résonances lipidiques a été proposée dans l'étude présentée au chapitre 3. Cependant, lors de ces diverses études, il a été observé que la quantification de la composition des lipides hépatiques n'est pas réalisable pour des fractions lipidiques faibles.

La mesure du temps de relaxation T_1 de ces résonances peut être d'intérêt lors de certaines acquisitions de SRM dans le cas où une correction en T_1 est nécessaire avant la quantification comme exposé précédemment dans le chapitre 4. La mesure du T_1 des résonances de l'eau et des lipides hépatiques pourrait également présenter un intérêt pour le diagnostic de la stéatose. En effet, une précédente étude a montré, sur des objets-tests, une variation de ce paramètre intrinsèque de la RMN, en fonction de la FL [21]. Notre hypothèse, dans le cas où ces résultats seraient vérifiés *in vivo*, est que le T_1 de la résonance de l'eau pourrait être un biomarqueur de la stéatose.

Dans ce chapitre, la problématique de la mesure *in vivo* du temps de relaxation T_1 est présentée et des développements méthodologiques pour son application dans un contexte pré-clinique sont exposés. Enfin, des tests de validation sur objets-tests et une évaluation préliminaire *in vivo* sont détaillés.

5.1 Mesure *in vivo* du temps de relaxation T_1

5.1.1 Problématique

La méthode de référence pour la mesure du T_1 par SRM est l'acquisition de plusieurs spectres pour différentes valeurs de TR afin d'observer la recroissance de

la composante longitudinale de l'aimantation propre à chaque groupement de moments magnétiques nucléaires, et donc à chaque groupement chimique. Cependant, cette méthode est inapplicable *in vivo* pour deux raisons :

- elle est coûteuse en temps, avec un temps d'acquisition pouvant dépasser vingt-cinq minutes ;
- la nécessité de synchroniser l'acquisition sur la fréquence respiratoire affecte le TR réellement appliqué ($TR_{effectif}$) lors de l'acquisition.

En effet, les acquisitions de SRM sont souvent longues par rapport aux acquisitions d'IRM. Par exemple, pour la mesure du T_1 du tissu hépatique *in vivo* chez la souris sur une installation à 4,7 T, l'acquisition d'IRM durera environ 10 min. Ceci correspond approximativement à la durée de l'acquisition du spectre de SRM avec le TR le plus long (généralement $5T_1$) suffisamment accumulé pour l'obtention d'un SNR approprié à la quantification de la majorité des résonances lipidiques, sachant que d'autres acquisitions avec des TR plus courts sont nécessaires. Cependant, il est important de noter que la SRM permet d'envisager la mesure du T_1 de chaque résonance lipidique alors l'IRM ne propose qu'une mesure du T_1 du tissu hépatique dans sa globalité.

Si le coût en temps est un frein à la mesure du T_1 *in vivo*, le principal obstacle est le fait que le TR appliqué lors d'une acquisition doit être parfaitement connu dans le but de recalculer les données obtenues sur une courbe de recroissance de l'aimantation en T_1 . Or, lors de l'utilisation de la synchronisation de l'acquisition sur la fréquence respiratoire (figure 5.1), une accumulation de la séquence sera lancée après un front montant du schéma de respiration et sera suivie d'autres accumulations de façon à n'acquérir le signal que sur le palier haut de la respiration. Si un front descendant arrive au moment où l'accumulation suivante doit être lancée, l'acquisition est mise en pause jusqu'au prochain front montant. Ceci aura pour effet d'augmenter la valeur du TR , au moins pour quelques accumulations, entraînant une surévaluation du signal en fin d'acquisition, et donc un biais dans la mesure du T_1 , surtout dans le cas d'un TR court. Cependant, l'acquisition du signal sans utilisation de la synchronisation n'est pas envisageable. Dans ce cas, les accumulations seraient réalisées avec le TR consigne, mais certains signaux seraient issus de zones hors du voxel d'intérêt n'ayant pas atteint le régime d'équilibre, d'où une surévaluation du signal final (figure 5.1).

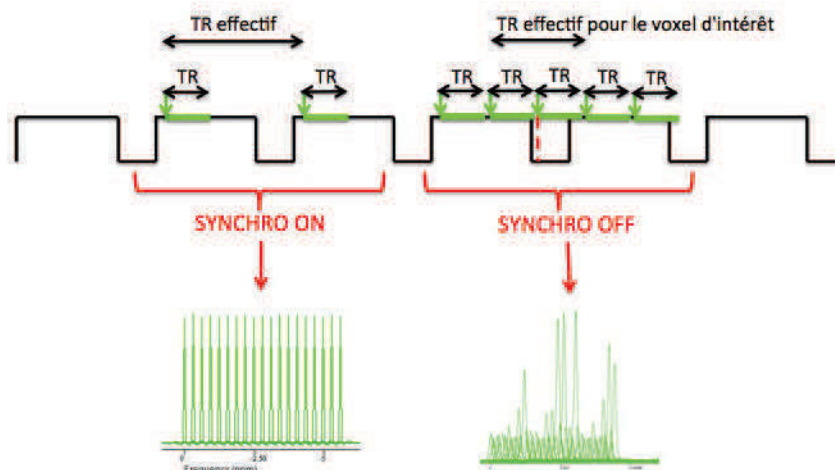


FIGURE 5.1 – Schématisation de la synchronisation des acquisitions sur la fréquence respiratoire. Avec l'utilisation de la synchronisation, les acquisitions sont déclenchées après un front montant du schéma respiratoire. La prochaine accumulation est déclenchée à suivre si le TR est suffisamment court pour que toute la séquence tienne sur le palier de la respiration, sinon le prochain front montant est attendu, entraînant un TR_{effectif} plus long, mais une amplitude du signal stable. Sans synchronisation, les accumulations s'enchaînent, certaines réalisant une acquisition sur un palier bas de la respiration et donc un voxel différent. Une amplitude plus élevée du signal est alors observée, issue d'un voxel dont l'aimantation n'a pas atteint le régime d'équilibre. Le TR_{effectif} entre les deux accumulations dont le signal est acquis sur les paliers hauts de part et d'autre du palier bas est alors plus élevé que le TR consigne, provoquant une aimantation du voxel d'intérêt plus élevée que lors du régime d'équilibre.

Une étude récente publiée par Hamilton *et al.* [100] présente l'utilisation d'une séquence STEAM modifiée dans le but d'acquérir plusieurs spectres de SRM, avec différents TE et TR , au cours d'une seule apnée du patient. Ceci permet une réduction considérable du temps d'acquisition, et a surtout l'avantage de ne pas avoir à répéter plusieurs acquisitions lors de plusieurs apnées comme cela a été utilisé dans d'autres études [12, 19], pouvant induire une mesure de ces signaux dans des voxels légèrement différents. De plus, une mesure simultanée du T_1 , du T_2 et de la PDFF (*Proton Density Fat Fraction* en anglais) est effectuée à partir des données issues de cette nouvelle séquence. Malgré tous ces avantages, un inconvénient majeur à l'application de cette méthode en clinique est la non disponibilité de la séquence, de manière native, sur les spectromètres imageurs hospitaliers. Cette méthode ne sera, en revanche, pas applicable dans le cadre d'une étude pré-clinique puisqu'une apnée de l'animal n'est pas envisageable.

L'objectif des développements méthodologiques présentés dans ce chapitre a donc été de mesurer le T_1 de l'eau et de la résonance majeure des lipides (*Lip13*) par

SRM, de façon rapide et en utilisant les séquences fournies par le constructeur du spectromètre imageur utilisé.

5.1.2 Nouvelle méthode LOREEDE

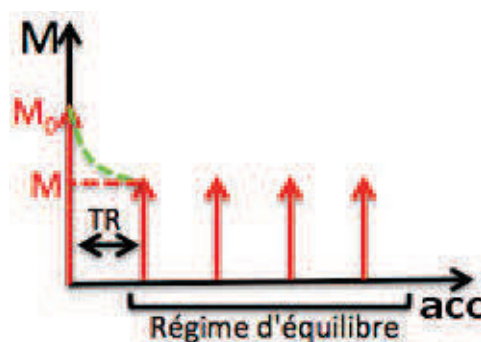


FIGURE 5.2 – Principe de la mesure du T_1 par la méthode LOREEDE. Entre la première et la seconde accumulation (acc), séparées d'un temps TR , l'aimantation longitudinale M n'a pas eu le temps de retrouver sa valeur initiale M_0 . La relation liant M , M_0 et TR est dépendante du T_1 du métabolite concerné, d'où la possibilité de la mesure de ce T_1 .

La méthode de mesure rapide du T_1 *in vivo* proposée dans ce chapitre utilise le phénomène de mise en régime d'équilibre de l'aimantation lors des premières accumulations d'une séquence de SRM (cf figure 1.8 du chapitre 1 page 30). Elle sera notée LOREEDE (pour *Longitudinal Relaxation time Evaluation from Dynamic Equilibrium* en anglais) dans la suite de ce manuscrit. Habituellement, les signaux générés par les premières accumulations ne sont pas enregistrés, et ne sont donc pas utilisés pour la production du signal final (somme des accumulations) ; ces accumulations sont notées "dummy scans" dans les logiciels d'acquisition. L'aimantation longitudinale n'a pas le temps de retrouver sa valeur initiale pendant le temps TR entre les impulsions RF d'excitation de la première et de la seconde accumulation, car $TR < 5T_1$ lors de l'acquisition. En enregistrant séparément les spectres issus des signaux recueillis pour ces deux accumulations lors de l'utilisation d'une séquence PRESS (pas d'utilisation de "dummy scans"), il est possible d'observer la décroissance de l'aimantation longitudinale (figure 5.2) en fonction du T_1 . Par la quantification des résonances présentes sur les spectres ainsi obtenus, les valeurs de T_1 correspondant aux groupements chimiques concernés par ces résonances sont extraites suivant l'équation suivante :

$$M = M_0 \left[1 - \exp\left(-\frac{TR}{T_1}\right) \right] \quad (5.1)$$

L'avantage de cette méthode est la rapidité d'acquisition des signaux par l'utilisation d'un TR très court (240 ms dans nos conditions expérimentales). De plus, seules deux accumulations sont nécessaires étant donné que les valeurs de T_1 sont mesurées à partir des données spectrales de ces deux premiers signaux. En revanche, chaque spectre étant acquis à partir d'une seule accumulation, un faible SNR est obtenu, empêchant la quantification des résonances de faible amplitude. De fait, dans le cas de spectres acquis en présence d'eau et de lipides (objets-tests, tissu hépatique), l'évaluation du T_1 de la résonance majeure des lipides (*Lip13*) est réalisable uniquement pour des fractions lipidiques dépassant 10%.

L'enregistrement des signaux de chaque accumulation est possible nativement sur les spectromètres imageurs cliniques. Or, lors du développement de la méthode LOREDE, un imageur Bruker dédié au petit animal a été utilisé. L'acquisition de tous les signaux avant leur somme finale n'est pas une option proposée par le constructeur. Il a donc été nécessaire de modifier le code de la séquence PRESS fournie par Bruker pour la suite de l'étude.

5.2 Modification de la séquence PRESS de Bruker

5.2.1 Problème rencontré avec la séquence du constructeur

Comme dit précédemment, l'enregistrement séparé des signaux issus de chaque accumulation, lors d'une acquisition PRESS, n'est pas proposé dans les options du spectromètre imageur Bruker dédié au petit animal utilisé dans notre étude. En revanche, il est possible de forcer cet enregistrement (dans le fichier "`fid.raw`") par l'utilisation de l'option "`Retro Frequency Lock = On`" ayant pour objectif de corriger une dérive du champ magnétique \vec{B}_0 en recalant les spectres sur la résonance de référence avant leur somme. Cependant, pour réaliser ce recalage, un "`navigateur`" est utilisé. Ce navigateur est un schéma PRESS, dont l'angle de basculement de la première impulsion RF est modifiable, ajouté à la suite du schéma PRESS de chaque accumulation (figure 5.3). Le signal produit par ce navigateur est enregistré dans le fichier "`fid.ref`".

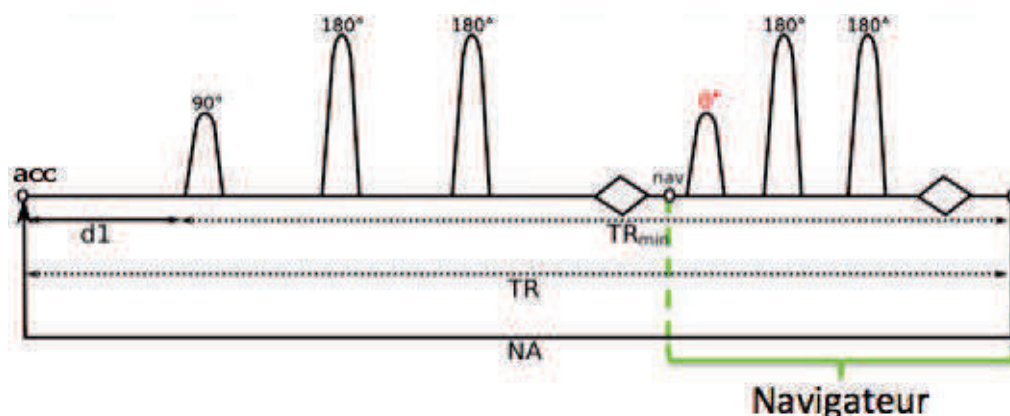


FIGURE 5.3 – Schéma d'une boucle de séquence PRESS avec l'utilisation du navigateur. Ce motif sera répété NA fois en fonction du nombre d'accumulations souhaitées (acc). Le délai "d1" est ajouté à chaque début d'accumulation avant la première impulsion RF dans le cas où le TR consigne ("TR(PVM)") est plus long que le "TRmin".

Ce navigateur a été utilisé avec l'angle de basculement le plus petit possible, pour limiter la perturbation de la recroissance de l'aimantation longitudinale. Les spectres obtenus à partir des signaux produits à la suite de chaque accumulation ont pu être observés séparément les uns des autres par lecture des données brutes du fichier "**fid.raw**".

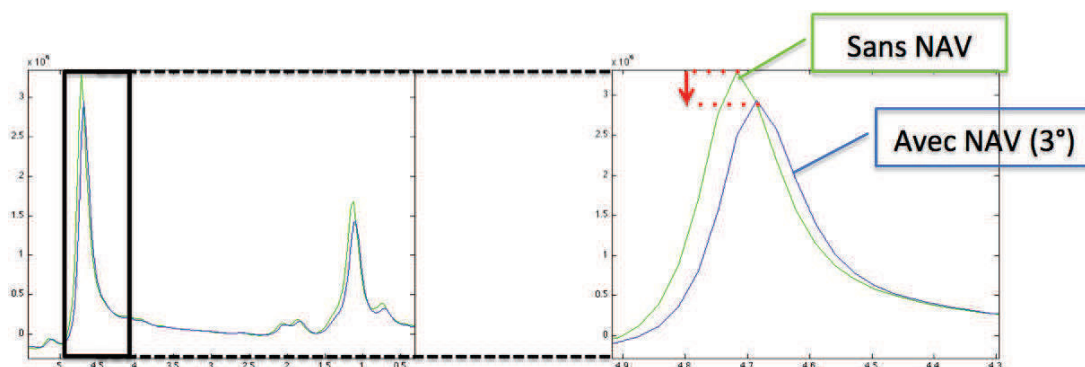


FIGURE 5.4 – Comparaison entre le spectre issu de la somme des signaux obtenus par une séquence PRESS avec un "navigateur" d'angle 3° (bleu), et le spectre acquis par une séquence PRESS sans "navigateur" utilisant les mêmes paramètres (vert). Les spectres ont été acquis à 4,7 T dans un jaune d'œuf.

Cependant, après la somme de ces signaux, le spectre obtenu est différent de celui acquis avec les mêmes paramètres (TR , TE , voxel, nombre d'accumulations) sans utilisation du "navigateur". Sur la figure 5.4, une nette diminution de l'amplitude du signal acquis avec le "navigateur" (NAV) est observée. Ceci s'explique

par l'effet du basculement de l'aimantation induit par le "navigateur", ainsi que l'augmentation du TR réel par l'ajout du module du navigateur avant l'excitation suivante. Il a été conclu que le navigateur, même en minimisant au maximum l'angle utilisé, perturbait la recroissance de l'aimantation longitudinale et rendait impossible la mesure du T_1 à partir de ces acquisitions.

5.2.2 Solution proposée

L'enregistrement des signaux de chacune des accumulations n'étant réalisé que lorsque l'option introduisant le navigateur est choisie, la solution proposée a été de modifier le code de la séquence de façon à ce que le navigateur soit remplacé par un nouveau schéma PRESS (figure 5.5).

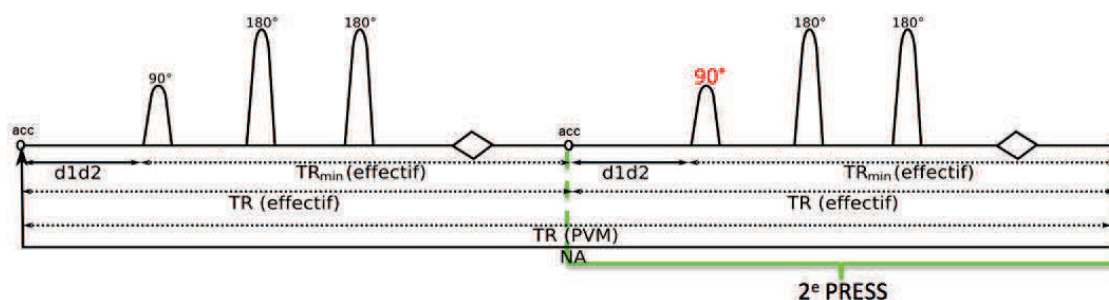


FIGURE 5.5 – Schéma d'une boucle de séquence PRESS avec "navigateur" modifiée (acPRESS). A la place du navigateur, la boucle pointe vers un nouveau schéma PRESS. Le délai " $d1d2$ ", égal à la moitié du délai " $d1$ ", a été défini pour apparaître en début de chaque schéma PRESS. Le " $TR(PVM)$ " correspond au TR consigne, sélectionné par l'utilisateur lors du choix des paramètres de la séquence. En raison de la modification de la boucle, il est important de noter que le TR réellement utilisé pour les deux acquisitions PRESS de ce schéma est le $TR_{effectif}$ valant la moitié du " $TR(PVM)$ ".

La nouvelle méthode développée à partir des modifications effectuées dans les fichiers codants pour la méthode PRESS du constructeur, sera identifiée sous le nom acPRESS dans ce chapitre. Le logigramme présenté par la figure 5.6 définit les différents fichiers composant le code de la méthode acPRESS, leurs relations, ainsi que les modifications apportées lors des travaux présentés dans ce chapitre.

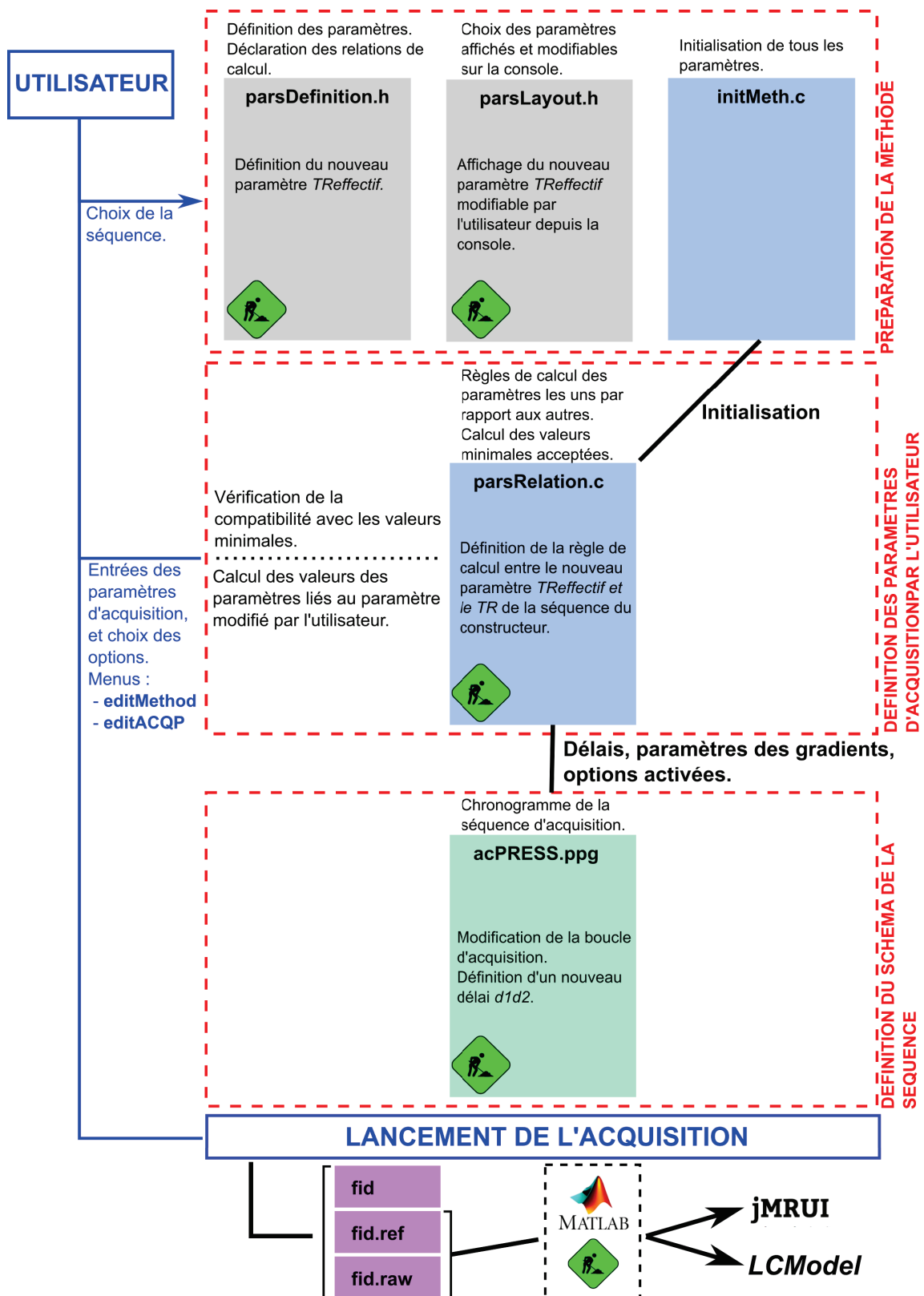


FIGURE 5.6 – Logigramme présentant les relations entre les fichiers codant pour la méthode acPRESS, leurs rôles, et les développements réalisés. Les fichiers modifiés lors de ces travaux sont identifiés par le logo vert.

Cette modification est effectuée à partir du fichier "PRESS.ppg", écrit dans un langage de programmation propre au constructeur Bruker, codant pour la séquence PRESS.

La balise "nav", impliquant l'utilisation du code du "navigateur", a été remplacée par la balise "av". Pour le programme, le "navigateur" est utilisé, cependant la balise dirige vers une nouvelle boucle de la séquence PRESS. Le délai "d1" appliqué à chaque début de schéma PRESS avant l'application de la première impulsion RF, dans le cas où le TR consigne ("TR(PVM)"), sélectionné par l'utilisateur, est plus long que le "TRmin", a dû être redéfini. Le délai "d1d2", égal à la moitié du délai "d1", a ainsi remplacé "d1" pour que le "TR(PVM)" (TR entré comme consigne dans la console lors d'une acquisition) soit construit de la même manière que dans la séquence PRESS du constructeur. Une accumulation effectue donc l'acquisition de deux signaux PRESS, l'un dans le fichier "fid.raw", et l'autre dans le fichier "fid.ref".

A l'exception du fichier programmant la séquence d'acquisition, tous les fichiers utilisés pour définir une méthode (par exemple PRESS), sont codés en langage C. Les fichiers "parsDefinition.h" et "parLayout.h" définissent les prototypes des paramètres, et l'affichage de ces paramètres sur l'interface de la console Bruker. Il est important de noter que, sans modification de ces fichiers, le TR entré par l'utilisateur sur l'interface de la console Bruker ("TR(PVM)"), lors du choix des paramètres de la séquence, est le TR d'une accumulation (contenant deux signaux acquis). D'où le TR de chacun des signaux acquis ($TR_{effectif}$) est égal à la moitié du "TR(PVM)". Pour permettre l'utilisation de cette séquence sans risque d'erreur entre les différents paramètres liés au TR présentés ici, le nouveau paramètre $TR_{effectif}$ a été ajouté aux paramètres de la séquence acPRESS (fichier "parsDefinition.h"), sur l'interface de la console Bruker (fichier "parLayout.h"). Enfin, la règle de calcul liant le $TR_{effectif}$ au "TR(PVM)" a été ajoutée dans le fichier "parsRelation.c".

Pour l'utilisation des données ainsi acquises, la première étape est de rassembler toutes les données brutes, issues des fichiers "fid.raw" et "fid.ref". Ceci a été réalisé par le développement d'un programme *Matlab* (Version 8.1, Matworks, Natick, MA, USA) produisant un fichier contenant tous les signaux, et lisible par *jMRUI v5.0* [65, 66] (<http://www.jmrui.eu>), ainsi que les fichiers destinés à l'analyse des signaux issus de la première accumulation (et correspondant à deux accumulations successives d'une séquence PRESS du constructeur) par le logiciel *LCModel*. Le logiciel *jMRUI* permet un affichage rapide de tous les spectres acquis

séparément lors de l'acquisition (figure 5.7) permettant une validation visuelle des données (régime d'équilibre, stabilité du signal), ce qui n'est pas réalisable avec le logiciel *LCModel*. A partir du fichier contenant toutes les données brutes, la somme des signaux pour la construction du spectre final est possible (figure 5.7).

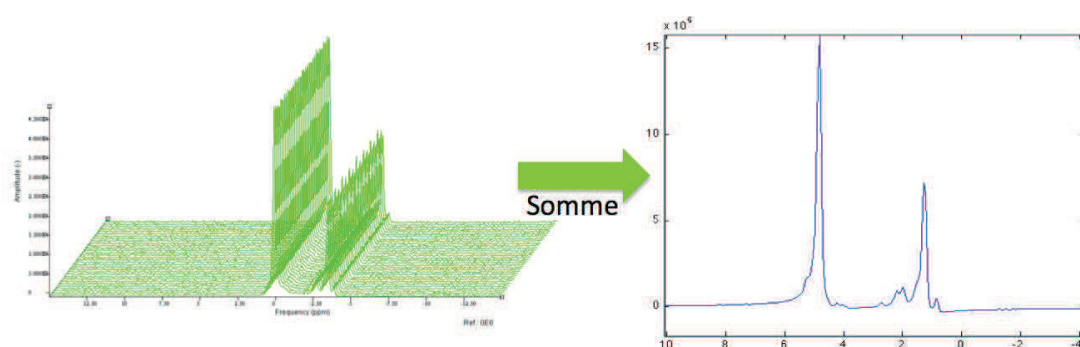


FIGURE 5.7 – Visualisation des spectres individuels par le logiciel jMRUI v5.0 [65, 66] (<http://www.jmrui.eu>) à partir du fichier créé par Matlab, et somme de ces données par Matlab (Version 8.1, Matworks, Natick, MA, USA) pour l'obtention du spectre final (bleu).

De la même manière que dans la partie précédente, un spectre obtenu après la somme de tous les signaux issus d'une acquisition avec la séquence acPRESS, a été comparé à un spectre acquis avec les mêmes paramètres, mais l'utilisation d'une séquence PRESS du constructeur. Les spectres obtenus par ces deux acquisitions se superposent parfaitement (figure 5.8) et aucune différence entre les deux signaux n'est observable. Ces résultats ont permis la validation de la séquence acPRESS qui a alors été utilisée dans la suite de cette étude pour la mesure du T_1 de l'eau et de la composante majeure des lipides (*Lip13*) par la méthode LOREDEE.

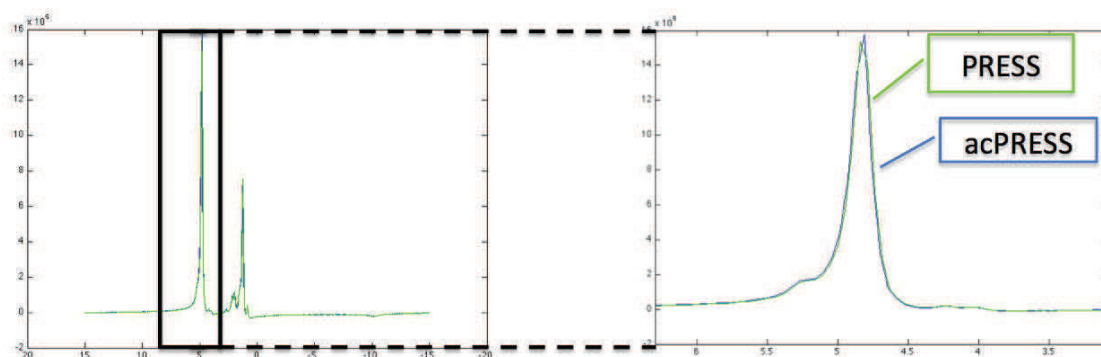


FIGURE 5.8 – Comparaison entre un spectre acquis avec la séquence modifiée acPRESS (bleu) et un spectre acquis avec une séquence PRESS classique (vert).

5.3 Validation de la méthode LOREEDE

5.3.1 Validation sur objets-tests

Dans le but d'évaluer la mesure du T_1 par SRM en utilisant la méthode LOREEDE, deux objets-tests ont été utilisés. Le premier présentant une résonance unique, celle provenant des protons de l'eau, et le second ayant pour but de simuler la composition du tissu hépatique. Dans les deux cas, les valeurs de T_1 mesurées par la méthode LOREEDE ont été comparées à celles obtenues par la méthode de référence, à savoir l'utilisation de plusieurs TR .

Préparation des objets-tests

Le premier objet-test est un tube FALCON de 15 ml rempli d'un gel d'agar-agar préparé à partir d'une solution d'eau distillée et de gadolinium à 0,25 mmol/L. Le gadolinium a été ajouté pour obtenir un T_1 de la résonance d'eau de 700 ms à 4,7 T.

Le deuxième objet-test utilisé a été un œuf cru. Les acquisitions ont été réalisées sur le jaune d'œuf présentant une fraction lipidique comprise entre 32% et 36% [109, 110].

Protocole d'acquisition et de traitement des données spectrales

Les acquisitions ont été réalisées à 4,7 T sur un spectromètre imageur dédié au petit animal (47/40 USR Bruker Biospec, Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen, Germany), muni d'un canon de gradient BGA12 (force maximum de 400 mT/m) et d'une bobine RF volumique en quadrature de 72 mm de diamètre interne. Pour la mesure du T_1 par la méthode de référence, huit spectres de SRM ont été acquis dans un voxel de 4x4x4 mm³ en utilisant la séquence PRESS du constructeur, avec les paramètres suivants (durée totale des acquisitions = 7 min 20 s) :

- huit valeurs de TR allant de 120 à 5000 ms ;
- $TE = 11$ ms ;
- nombre d'accumulations = 32 ;
- nombre de "dummy scans" = 4.

Pour la mesure du T_1 par la méthode LOREEDE, la séquence acPRESS a été utilisée avec les paramètres suivants (durée de l'acquisition = 2,4 s) :

- $TR = 240$ ms ;
- $TE = 11$ ms ;

- nombre d'accumulations = 10 ;
- nombre de "dummy scans" = 0.

Le TR a été choisi de façon à être suffisamment court afin d'observer une pondération en T_1 franche entre les deux premiers spectres acquis, et de permettre une acquisition très rapide des signaux d'intérêt (toujours dans la problématique d'une mesure *in vivo*). Cependant, le TR le plus court accepté par le spectromètre imageur (à savoir 120 ms dans nos conditions expérimentales) n'a pas été utilisé dans le but de conserver une sensibilité permettant la quantification des résonances d'intérêt, sachant que le signal traité n'est pas accumulé.

Les spectres ont été traités avec le logiciel *LCModel* sans introduction de connaissance *a priori*, utilisant la base simulée "Lipid-8". L'option "roomt=True" a été utilisée pour prendre en compte que les acquisitions ont été effectuées à température ambiante et non corporelle, ayant pour effet le décalage de la résonance de l'eau.

Résultats

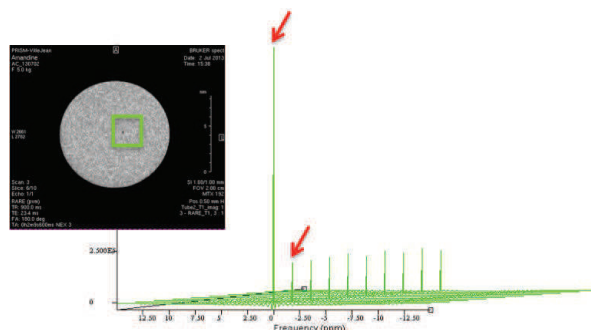


FIGURE 5.9 – Spectres acquis avec la séquence *acPRESS* dans un voxel d'intérêt placé dans le tube de gel. Les flèches rouges indiquent les deux spectres à partir desquels la valeur du T_1 de l'eau a été mesurée.

Les spectres obtenus sur le tube de gel sont présentés sur la figure 5.9. On observe l'arrivée au régime d'équilibre de la résonance de l'eau dès le deuxième spectre. La quantification de cette résonance, sur les deux premiers spectres acquis, avec le logiciel *LCModel* a permis la mesure du T_1 par la méthode LOREDEE : $T_1 = 693 \pm 17$ ms. La valeur du T_1 de la résonance de l'eau mesurée par la méthode de référence sur le même voxel est de 693 ± 10 ms.

5.3.2 Validation *in vivo* sur modèle animal : étude préliminaire

Animal, protocole d'acquisition et de traitement

Les acquisitions ont été réalisées sur une souris femelle c57BL/6JRj (*wild-type*. Animalerie centrale ARCHE Biosit, Campus Villejean, Université de Rennes 1). Une anesthésie gazeuse par isoflurane (induction 3%, maintien 1,5%) a été utilisée. Toutes les expérimentations sur ces animaux ont été approuvées par le comité local d'éthique animale.

Les acquisitions ont été réalisées sur le même spectromètre imageur et avec le même matériel que pour la validation sur objets-tests (*cf* §5.3.1). La respiration de la souris a été suivie et utilisée pour la synchronisation des acquisitions sur la fréquence respiratoire. Les acquisitions de spectre de SRM avec différents TR n'étant pas réalisables pour la détermination des valeurs de T_1 de l'eau et de la résonance majeure des lipides (*Lip13*) *in vivo*, le T_1 du foie a été mesuré par une acquisition d'IRM en utilisant une séquence RARE à TR variable (RAREVTR_bas) avec les paramètres suivants (durée de l'acquisition = 6 min) :

- $TR = [110; 250; 400; 700; 1200; 3000]$ ms ;
- $TE = 13$ ms ;
- nombre de coupes = 1 ;
- épaisseur de coupe = 2 mm ;
- champ de vue = 4×4 cm² ;
- matrice = 128x128 ;
- nombre d'accumulations = 1 ;
- "RARE factor" = 2.

L'acquisition de SRM pour la mesure des valeurs de T_1 par la méthode LOREDE a été effectuée dans un voxel d'intérêt de $3 \times 3 \times 3$ mm³ placé dans une zone homogène du lobe droit hépatique de l'animal. La séquence acPRESS a été utilisée avec les paramètres suivants (durée de l'acquisition = 2,4 s) :

- $TR = 240$ ms ;
- $TE = 17$ ms ;
- nombre d'accumulations = 10 ;
- nombre de "dummy scans" = 0.

L'acquisition de SRM a été répétée trois fois.

L'analyse de l'image IRM pour la mesure du T_1 du foie a été faite à l'aide du logiciel *ParaVision 5.1* présent sur la station d'acquisition.

Les spectres ont été traités avec le logiciel *LCModel* sans introduction de connaissance *a priori*, utilisant la base simulée "Liver-8". La résonance de l'eau et la résonance majeure des lipides (*Lip13*) ont été les seules présentant une quantification suffisamment précise d'après les critères énoncés dans le chapitre précédent ($CRLB < 10\%$) pour permettre la mesure du T_1 .

Résultats

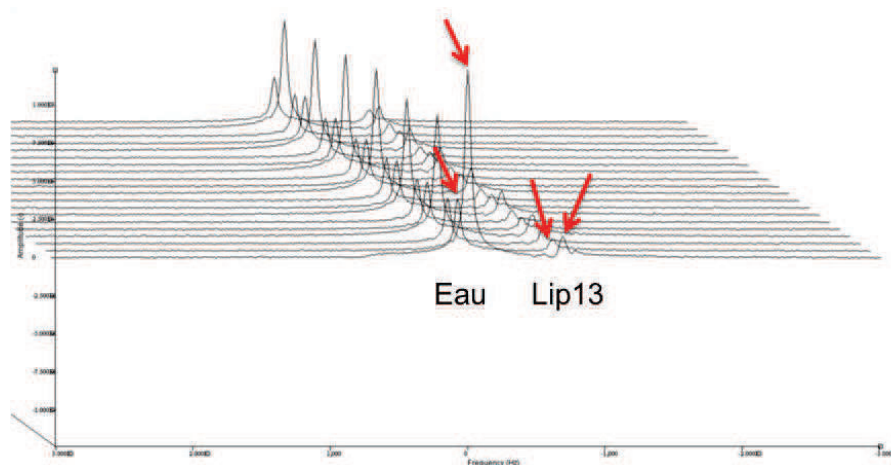


FIGURE 5.11 – Spectres acquis avec la séquence acPRESS dans un voxel d'intérêt placé dans le foie d'une souris. Les flèches rouges indiquent les résonances issues des deux spectres à partir desquelles les valeurs du T_1 de l'eau et de la résonance majeure des lipides (*Lip13*) ont été mesurées.

La fraction lipidique a été évaluée par l'acquisition d'un signal par une séquence PRESS classique ($TR = 2500$ ms, 256 accumulations) : $FL = 10,5\%$.

La figure 5.11 présente les spectres obtenus lors de l'acquisition de SRM réalisée avec la séquence acPRESS sur le foie d'une souris. Le régime d'équilibre a été atteint dès la deuxième accumulation pour la résonance majeure des lipides. En revanche pour la résonance de l'eau, le régime d'équilibre a été atteint à partir de la troisième accumulation. L'amplitude plus élevée de certaines résonances est due à la synchronisation de l'acquisition sur la respiration de la souris, d'où un TR plus long lors de certaines accumulations en raison de l'attente d'un nouveau front montant du schéma respiratoire pour déclencher de nouveau l'acquisition. Les valeurs moyennes de T_1 mesurées pour l'eau et la résonance *Lip13* ont été de 637 ± 11 ms et 230 ± 27 ms, respectivement. Par l'imagerie, le T_1 du tissu

hépatique a été mesuré à 548 ms.

Le T_1 mesuré par l'imagerie est le temps de relaxation longitudinale du tissu hépatique dans sa totalité. Le signal considéré pour cette mesure est issu de tous les composants présents sur le spectre acquis par SRM au même endroit. Grossièrement, on considère la contribution des signaux de l'eau et des résonances lipidiques, les autres métabolites étant présents en très faible quantité en comparaison (la choline, par exemple). Dans le cas particulier des acquisitions sur cette souris, il est possible de faire l'approximation d'une participation du signal de l'eau, et d'une participation du signal de la résonance majeure des lipides (*Lip13*), les autres résonances lipidiques étant négligeables. Il est alors possible d'effectuer l'approximation suivante concernant l'équation du signal dans le voxel d'intérêt :

$$\underbrace{1 - \exp\left(-\frac{TR}{T_1^{Foie}}\right)}_{S_1} = \underbrace{FL \left[1 - \exp\left(-\frac{TR}{T_1^{Lip13}}\right)\right] + (1 - FL) \left[1 - \exp\left(-\frac{TR}{T_1^{Eau}}\right)\right]}_{S_2} \quad (5.2)$$

où T_1^{Foie} , T_1^{Lip13} et T_1^{Eau} , représentent les valeurs de T_1 mesurées pour le tissu hépatique par IRM, la résonance majeure des lipides et de l'eau par SRM, respectivement. En utilisant, pour le calcul du membre S_2 de cette équation, les valeurs de T_1 précédemment déterminées la résonance majeure des lipides (230 ms) et de l'eau (637 ms), la valeur calculées a été 0,3490. D'après l'hypothèse posée par l'équation où $S_1 = S_2$, en utilisant la valeur $TR = 240$ ms, le T_1 du foie obtenue par l'utilisation de la méthode de SRM LOREDE est de 559 ms.

Discussion

Les résultats issus de la mesure du T_1 par l'IRM (utilisée ici comme référence), et de la mesure du T_1 par la notre nouvelle méthode de SRM LOREDE correspondent lorsque l'on utilise l'équation 5.2 comme élément de comparaison. Une comparaison directe ne peut être faite car il n'est pas possible de mesurer les valeurs de T_1 de l'eau et de la résonance *Lip13* séparément à partir de la même image. L'erreur absolue lors de la mesure du T_1 de la résonance *Lip13* est plus élevée que celle obtenue pour la mesure du T_1 de l'eau. Cela semble logique étant donné la relativement faible FL présente dans le foie de la souris, induisant une faible amplitude de la résonance *Lip13*, la rendant moins facilement quantifiable surtout sur le spectre correspondant à la deuxième accumulation.

5.4 Conclusion

Dans ce chapitre, une nouvelle méthode de mesure du T_1 par SRM des métabolites présents dans un voxel d'intérêt est proposée. L'acquisition de cette méthode est rapide, et le traitement des données peu coûteux en temps lorsque l'imageur propose l'enregistrement séparé des données issues de chaque accumulation du signal. La méthode LOREEDE nécessite une assez forte concentration des métabolites pour permettre l'évaluation des valeurs de T_1 qui leur sont associées. Le signal utilisé n'étant pas accumulé, le SNR sera faible, et une résonance issue d'un métabolite dont la concentration est relativement faible ne sera pas quantifiable. Pour cette raison, il semble que l'application majeure qui puisse être envisagée pour cette méthode est l'évaluation du T_1 de l'eau *in vivo*, notamment au niveau hépatique. La possibilité de la mesure du T_1 des résonances associées aux lipides sera asservie à la concentration lipidique et donc à la fraction lipidique. D'autre part, l'utilisation de cette méthode dans d'autres applications telles que le cerveau, par exemple, ne semble pas appropriée. Ceci en raison du peu d'intérêt de la mesure du T_1 de l'eau dans ce type de problématique, et des faibles concentrations des autres métabolites induisant la nécessité de l'ajout d'un module de suppression d'eau dans la séquence d'acquisition. De plus, la méthode de référence est applicable dans ce cas en raison de l'absence de mouvement puisque l'utilisation de la synchronisation des acquisitions sur la fréquence respiratoire n'est pas nécessaire.

Les tests de validation de la méthode LOREEDE ont eu pour objectif d'évaluer l'applicabilité pour mesurer le T_1 dans un contexte hépatique. La première conclusion mise en évidence est la mesure du T_1 de l'eau de manière très précise. La mesure du T_1 de la résonance majeure des lipides (*Lip13*) semble sujette à plus d'erreur, sans doute en raison du faible SNR des spectres obtenus par une seule accumulation. Une autre piste à explorer serait l'optimisation du TR utilisé afin de permettre la mesure du T_1 de la résonance *Lip13*. Un TR plus court induirait moins de perte de signal, d'où une quantification plus aisée de la résonance dont l'amplitude n'est pas aussi élevée que celle de l'eau, par exemple. La vitesse d'acquisition des données nécessaires à la méthode LOREEDE permet la prise en considération de la mesure de plusieurs T_1 via plusieurs jeux de données.

Enfin, les résultats de ce chapitre suggèrent la possibilité de mesurer le T_1 de l'eau dans le tissu hépatique *in vivo* par SRM, en utilisant la méthode LOREEDE.

Une étude plus approfondie sur un plus grand nombre de souris sera nécessaire à la validation complète de cette méthode. Cependant, si la variation du T_1 de l'eau en fonction de la fraction lipidique contenue dans le voxel d'intérêt est confirmée [21], cette méthode permet d'envisager l'étude d'un potentiel nouveau biomarqueur pour le diagnostic et la quantification de l'état de stéatose de manière rapide et non-invasive.

Conclusion générale

Motivée par le besoin grandissant de nouveaux biomarqueurs pour le diagnostic et le suivi de la stéatose, de manière non-invasive, la problématique principale de ce manuscrit a été l'étude de la quantification de la composition en AG des lipides par SRM *in vivo*. Au cours des travaux de thèse présentés, un questionnement a été porté sur chaque étape du protocole, de l'acquisition au calcul de quantification, en passant par le traitement des données spectrales; et ce dans le cadre d'études sur des objets-tests et *in vivo*, dans un contexte pré-clinique à 4,7 T et clinique à 3,0 T, lors d'applications sur du tissu hépatique et mammaire. En plus de la quantification de la composition des lipides hépatiques par l'utilisation d'un algorithme de calcul à partir des données extraites du spectre de SRM acquis, une méthode de mesure par SRM *in vivo* du temps de relaxation T_1 de l'eau et de la résonance principale des lipides a été développée, ayant pour objectif la proposition d'un nouveau biomarqueur de la stéatose.

Les travaux de recherche bibliographique pour répondre à la problématique de cette thèse, ont mené au constat qu'il n'existait pas de méthode de référence pour l'acquisition du signal de SRM *in vivo* utilisé pour la quantification de la composition des AG des lipides hépatiques. Notamment concernant l'utilisation ou non d'un module de suppression du signal de l'eau au cours du protocole d'acquisition. L'étude de la littérature montre qu'aucune étude préalable ne présente une évaluation quantitative de l'effet de cette suppression du signal de l'eau sur la quantification des résonances lipidiques. L'objectif du troisième chapitre de ce manuscrit a donc été de répondre à cette interrogation en utilisant le logiciel *LCModel* (Version 6.3-0L, Stephen Provencher, Oakville, ON, Canada) [64]. Les résultats de notre étude, obtenus sur des données pré-cliniques à 4,7 T et cliniques à 3,0 T, ont montré que l'utilisation de la suppression du signal de l'eau, dans nos conditions expérimentales, n'apportait aucune amélioration quant à la quantification des résonances lipidiques. De plus, une détérioration de l'information spectrale des signaux proches du signal de l'eau n'a pu être écartée. Dans ces conditions expérimentales, le protocole d'acquisition peut donc être considérablement raccourci par l'acquisition d'un seul spectre de SRM, sans suppression du signal de l'eau. Enfin, notre étude a donc mis en évidence que le recours systématique à une suppression du signal de l'eau pour des études en SRM *in vivo* est contestable. Il apparaît important qu'avant toute étude de ce type, une étude similaire à celle présentée dans le troisième chapitre de ce manuscrit soit effectuée, dans les conditions expérimentales envisagées, afin de déterminer si la suppression du signal de l'eau

CONCLUSION

présente un intérêt.

De même que pour le protocole d'acquisition, différents algorithmes de quantification de la composition en AG des lipides ont été publiés dans la littérature, sans que l'un d'entre eux ne soit considéré comme une référence pour les travaux suivants. Ainsi, l'objectif du quatrième chapitre de ce manuscrit a été d'effectuer un état de l'art de ces algorithmes, présentant leur fonctionnement et leurs applications. Des travaux de validation de ces algorithmes, ont ensuite été réalisés sur des objets-tests à 4,7 T, puis *in vivo* dans le cadre d'applications au tissu hépatique, dans un contexte pré-clinique (4,7 T) sur modèle murin et clinique (3,0 T), ainsi qu'au tissu mammaire dans un contexte clinique (3,0 T). Au cours des travaux sur les objets-tests, les temps de relaxation T_1 et T_2 des différents groupements chimiques des AG ont été mesurés, et la nécessité d'une correction en T_1 et/ou T_2 a été évaluée, montrant que, dans nos conditions expérimentales, il n'était pas utile d'appliquer ce type de corrections. De plus, les résultats de notre étude ont montré qu'un seul et même algorithme ne pouvait pas convenir à la quantification de la composition en AG dans les différentes applications possibles. En effet, l'algorithme de *Corbin et al.* obtient les résultats attendus lors d'une étude sur du tissu hépatique, mais c'est l'algorithme de *Ren et al.* qui s'est montré le plus adapté pour une application de la quantification de la composition en AG des lipides du tissu adipeux.

La recherche de nouveaux biomarqueurs pour le diagnostic et le suivi de la stéatose, de manière non-invasive, a provoqué un intérêt grandissant envers le métabolisme lipidique du foie, et plus précisément la quantification de la composition en AG des lipides hépatiques. Les résultats présentés dans les troisième et quatrième chapitres ont mis en évidence l'importance de l'utilisation d'un protocole adapté aux conditions expérimentales, depuis l'acquisition jusqu'au traitement des données aboutissant aux résultats de quantification de la composition en AG des lipides. Cependant, même après de telles considérations, l'algorithme utilisé pour les calculs se heurte aux capacités réduites de quantification des résonances lipidiques d'intérêt dans le cas d'une faible fraction lipidique. La nécessité de développer d'autres biomarqueurs, complémentaires de la mesure de la fraction lipidique et de la quantification de la composition en AG des lipides, a motivé les travaux présentés dans le cinquième chapitre de ce manuscrit. En effet, une étude a été publiée [21], présentant une variation du temps de relaxation T_1 de la résonance

CONCLUSION

de l'eau et de la résonance majeure des lipides, en fonction de la fraction lipidique du mélange observé. La fraction lipidique étant d'un intérêt capital dans le diagnostic de la stéatose, il apparaît intéressant de pouvoir évaluer cette stéatose d'une seconde manière. La mesure du T_1 par la méthode de référence étant coûteuse en temps, la rendant difficile à utiliser en clinique, et inapplicable dans un contexte pré-clinique en raison de la respiration de l'animal, les travaux du cinquième chapitre ont eu pour objectif de développer une nouvelle méthode de mesure du T_1 par SRM *in vivo* (LOREEDE pour *Longitudinal Relaxation time Evaluation from Dynamic Equilibrium* en anglais). Pour cela, la séquence d'acquisition du constructeur a été modifiée, permettant l'acquisition séparée de tous les signaux issus de chaque accumulation, et des programmes ont été développés avec le logiciel *Matlab* (Version 8.1, Matworks, Natick, MA, USA) pour rendre la lecture de ces données possible par le logiciel *LCModel* et *jMRUI v5.0* [65, 66] (<http://www.jmrui.eu>). Les résultats du test de validation effectué *in vivo* à 4,7 T sur une souris montrent qu'il est possible de mesurer le T_1 de l'eau ainsi que de la résonance majeure des lipides dès une fraction lipidique de 10% (correspondant à une stéatose de grade 1).

En conclusion, les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit ont mis en évidence l'importance du choix du protocole d'acquisition et de l'algorithme de calcul pour la quantification de la composition en AG des lipides, en fonction des conditions expérimentales de l'étude. Ceci a été montré par des études quantitatives dans différents contextes (objets-tests/*in vivo* ; 4,7 T/3,0 T ; pré-clinique/clinique). Une nouvelle méthode de mesure du T_1 *in vivo* a été développée et validée lors d'une étude préliminaire sur une souris.

Les perspectives de ces travaux sont, d'une part, l'utilisation du protocole d'acquisition et des méthodes de traitement développés en SRM pour la quantification de la composition en AG des lipides hépatiques, lors d'études spécifiques sur l'effet de xénobiotiques ou régimes alimentaires particuliers, par exemple, sur des modèles animaux. Les travaux méthodologiques présentés dans ce manuscrit ont été réalisés dans le cadre d'acquisitions effectuées lors d'une étude spécifique, en collaboration avec l'équipe de Bernard FROMENTY (Unité Foie, Métabolisme, Cancer ; INSERM UMR991), ayant pour objectif l'observation de l'effet du paracétamol au niveau hépatique. Les résultats des acquisitions de SRM *in vivo* sont en cours d'exploitation, et des acquisitions de RMN HR-MAS sont en train d'être effectuées. D'autre part, la méthode de mesure du T_1 par SRM que j'ai développée (LO-

CONCLUSION

REEDE) a été validée lors d'une étude préliminaire sur une souris. Il serait maintenant intéressant d'effectuer la validation *in vivo*, au sein d'une cohorte d'animaux et/ou patients, afin de vérifier la pertinence de la mesure du T_1 de la résonance de l'eau comme nouveau biomarqueur pour le diagnostic et le suivi de la stéatose. Si cette hypothèse était vérifiée, l'utilisation combinée de la quantification de la composition en AG des lipides hépatiques et de la mesure du T_1 de la résonance de l'eau, permettrait d'accéder à une caractérisation *in vivo* très précise de la stéatose, même dans le cas d'une fraction lipidique très faible.

Bibliographie

- [1] Fabbrini, E., Sullivan, S., and Klein, S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease : biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology* (2010). **51**(2) :679–689.
- [2] Cowin, G.J., Jonsson, J.R., Bauer, J.D., Ash, S., Ali, A., Osland, E.J., Purdie, D.M., Clouston, A.D., Powell, E.E., and Galloway, G.J. Magnetic resonance imaging and spectroscopy for monitoring liver steatosis. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* (2008). **28**(4) :937–945.
- [3] Johnson, N.A., Walton, D.W., Sachinwalla, T., Thompson, C.H., Smith, K., Ruell, P.A., Stannard, S.R., and George, J. Noninvasive assessment of hepatic lipid composition : advancing understanding and management of fatty liver disorders. *Hepatology* (2008). **47**(5) :1513–1523.
- [4] Szczepaniak, L.S., Nurenberg, P., Leonard, D., Browning, J.D., Reingold, J.S., Grundy, S., Hobbs, H.H., and Dobbins, R.L. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content : prevalence of hepatic steatosis in the general population. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* (2005). **288**(2) :E462–E468.
- [5] Machann, J., Stefan, N., and Schick, F. ^1H MR spectroscopy of skeletal muscle, liver and bone marrow. *European journal of radiology* (2008). **67**(2) :275–284.
- [6] Bedogni, G., Bellentani, S., Miglioli, L., Masutti, F., Passalacqua, M., Castiglione, A., and Tiribelli, C. The Fatty Liver Index : a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC gastroenterology* (2006). **6**(1) :33.
- [7] Kotronen, A., Peltonen, M., Hakkarainen, A., Sevastianova, K., Bergholm, R., Johansson, L.M., Lundbom, N., Rissanen, A., Ridderstråle, M., Groop, L., et al. Prediction of non-alcoholic fatty liver disease and liver fat using metabolic and genetic factors. *Gastroenterology* (2009). **137**(3) :865–872.

- [8] Sasso, M., Beaugrand, M., De Ledingham, V., Douvin, C., Marcellin, P., Poupon, R., Sandrin, L., and Miette, V. Controlled attenuation parameter (CAP) : a novel VCTETM guided ultrasonic attenuation measurement for the evaluation of hepatic steatosis : preliminary study and validation in a cohort of patients with chronic liver disease from various causes. *Ultrasound in medicine & biology* (2010). **36**(11) :1825–1835.
- [9] Reeder, S.B., Cruite, I., Hamilton, G., and Sirlin, C.B. Quantitative assessment of liver fat with magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Journal of magnetic resonance imaging* (2011). **34**(4) :729–749.
- [10] Hamilton, G., Yokoo, T., Bydder, M., Cruite, I., Schroeder, M.E., Sirlin, C.B., and Middleton, M.S. In vivo characterization of the liver fat 1H MR spectrum. *NMR in Biomedicine* (2011). **24**(7) :784–790.
- [11] Thomas, E.L., Hamilton, G., Patel, N., O’Dwyer, R., Doré, C.J., Goldin, R.D., Bell, J.D., and Taylor-Robinson, S.D. Hepatic triglyceride content and its relation to body adiposity : a magnetic resonance imaging and proton magnetic resonance spectroscopy study. *Gut* (2005). **54**(1) :122–127.
- [12] Thomsen, C., Becker, U., Winkler, K., Christoffersen, P., Jensen, M., and Henriksen, O. Quantification of liver fat using magnetic resonance spectroscopy. *Magnetic resonance imaging* (1994). **12**(3) :487–495.
- [13] Massart, J., Robin, M.A., Noury, F., Fautrel, A., Lettéron, P., Bado, A., Eliat, P.A., and Fromenty, B. Pentoxifylline aggravates fatty liver in obese and diabetic ob/ob mice by increasing intestinal glucose absorption and activating hepatic lipogenesis. *British journal of pharmacology* (2012). **165**(5) :1361–1374.
- [14] Fromenty, B. Aggravation des hépatopathies liées à l’obésité par les xéno-biotiques. *Nutrition clinique et métabolisme* (2014). **28**(2) :95–101.
- [15] Ye, Q., Danzer, C.F., Fuchs, A., Vats, D., Wolfrum, C., and Rudin, M. Longitudinal evaluation of hepatic lipid deposition and composition in ob/ob and ob/+ control mice. *NMR in Biomedicine* (2013). **26**(9) :1079–1088.
- [16] Zancanaro, C., Nano, R., Marchioro, C., Sbarbati, A., Boicelli, A., and Osculati, F. Magnetic resonance spectroscopy investigations of brown adipose tissue and isolated brown adipocytes. *Journal of lipid research* (1994). **35**(12) :2191–2199.
- [17] Yeung, D.K., Lam, S.L., Griffith, J.F., Chan, A.B., Chen, Z., Tsang, P.H., and Leung, P.C. Analysis of bone marrow fatty acid composition using high-

- resolution proton NMR spectroscopy. *Chemistry and physics of lipids* (2008). **151**(2) :103–109.
- [18] Strobel, K., van den Hoff, J., and Pietzsch, J. Localized proton magnetic resonance spectroscopy of lipids in adipose tissue at high spatial resolution in mice in vivo. *Journal of lipid research* (2008). **49**(2) :473–480.
- [19] Ren, J., Dimitrov, I., Sherry, A.D., and Malloy, C.R. Composition of adipose tissue and marrow fat in humans by ^1H NMR at 7 Tesla. *Journal of lipid research* (2008). **49**(9) :2055–2062.
- [20] Corbin, I.R., Furth, E.E., Pickup, S., Siegelman, E.S., and Delikatny, E.J. In vivo assessment of hepatic triglycerides in murine non-alcoholic fatty liver disease using magnetic resonance spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* (2009). **1791**(8) :757–763.
- [21] Hu, H.H. and Nayak, K.S. Change in the proton T1 of fat and water in mixture. *Magnetic Resonance in Medicine* (2010). **63**(2) :494–501.
- [22] Bottomley, P.A. Selective volume method for performing localized NMR spectroscopy (1984). US Patent 4,480,228.
- [23] Frahm, J., Merboldt, K.D., and Hänicke, W. Localized proton spectroscopy using stimulated echoes. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* (1987). **72**(3) :502–508.
- [24] Haase, A., Frahm, J., Hanicke, W., and Matthaei, D. ^1H NMR chemical shift selective (CHESS) imaging. *Physics in medicine and biology* (1985). **30**(4) :341.
- [25] Ogg, R.J., Kingsley, R., and Taylor, J.S. WET, a T₁- and B₁-insensitive water-suppression method for in vivo localized ^1H NMR spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance, Series B* (1994). **104**(1) :1–10.
- [26] Tkáč, I., Starčuk, Z., Choi, I.Y., and Gruetter, R. In vivo ^1H NMR spectroscopy of rat brain at 1 ms echo time. *Magnetic Resonance in Medicine* (1999). **41**(EPFL-ARTICLE-177519) :649–656.
- [27] Crossingham, J. Interactive 3D Liver Anatomy. <http://pie.med.utoronto.ca/vliver> (2015).
- [28] Kuntz, E. and Kuntz, H.D. *Hepatology : Textbook and atlas*. Springer Science & Business Media (2009).
- [29] Collégiale des universitaires en hépato-gastro-entérologie (CDU-HGE). *Les fondamentaux de la pathologie digestive*. Elsevier Masson (2014).

- [30] Machado, M.V. and Cortez-Pinto, H. Non-alcoholic fatty liver disease : What the clinician needs to know. *World journal of gastroenterology : WJG* (2014). **20**(36) :12956.
- [31] Benhamou, J.P., Bircher, J., McIntyre, N., Rizzetto, M., and Rodes, J. *Hépatologie clinique (2e édition)*. Flammarion (2002).
- [32] Ratziu, V., Bellentani, S., Cortez-Pinto, H., Day, C., and Marchesini, G. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *Journal of Hepatology* (2010). **53**(2) :372–384.
- [33] Mansouri, A., Fromenty, B., Berson, A., Robin, M.A., Grimbirt, S., Beau-grand, M., Erlinger, S., and Pessayre, D. Multiple hepatic mitochondrial DNA deletions suggest premature oxidative aging in alcoholic patients. *Journal of hepatology* (1997). **27**(1) :96–102.
- [34] Burt, A.D., Mutton, A., and Day, C.P. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. In *Seminars in diagnostic pathology*, volume 15 (1998) 246–258.
- [35] Jolly, R.A., Ciurlionis, R., Morfitt, D., Helgren, M., Patterson, R., Ulrich, R.G., and Waring, J.F. Microvesicular steatosis induced by a short chain fatty acid : effects on mitochondrial function and correlation with gene expression. *Toxicologic pathology* (2004). **32**(2 suppl) :19–25.
- [36] Oleszczuk, A., Spannbauer, M., Tannapfel, A., Blüher, M., Hengstler, J., Pietsch, U.C., Schuhmacher, A., Wittekind, C., Hauss, J.P., and Schön, M.R. Regenerative capacity differs between micro-and macrovesicular hepatic steatosis. *Experimental and toxicologic pathology* (2007). **59**(3) :205–213.
- [37] Younossi, Z.M., Stepanova, M., Afendy, M., Fang, Y., Younossi, Y., Mir, H., and Srishord, M. Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* (2011). **9**(6) :524–530.
- [38] Ahmed, M. Non-alcoholic fatty liver disease in 2015. *World journal of hepatology* (2015). **7**(11) :1450.
- [39] Chalasani, N., Younossi, Z., Lavine, J.E., Diehl, A.M., Brunt, E.M., Cusi, K., Charlton, M., and Sanyal, A.J. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease : Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* (2012). **55**(6) :2005–2023.

- [40] Marchesini, G., Moscatiello, S., Di Domizio, S., and Forlani, G. Obesity-associated liver disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* (2008). **93**(11_supplement_1) :s74–s80.
- [41] d’Assignies, G., Ruel, M., Khiat, A., Lepanto, L., Chagnon, M., Kauffmann, C., Tang, A., Gaboury, L., and Boulanger, Y. Noninvasive quantitation of human liver steatosis using magnetic resonance and bioassay methods. *European radiology* (2009). **19**(8) :2033–2040.
- [42] Poynard, T., Ratziu, V., Naveau, S., Thabut, D., Charlotte, F., Messous, D., Capron, D., Abella, A., Massard, J., Ngo, Y., et al. The diagnostic value of biomarkers (SteatoTest) for the prediction of liver steatosis. *Comparative Hepatology* (2005). **4**(1) :10.
- [43] Poynard, T., Imbert-Bismut, F., Munteanu, M., Messous, D., Myers, R.P., Thabut, D., Ratziu, V., Mercadier, A., Benhamou, Y., and Hainque, B. Overview of the diagnostic value of biochemical markers of liver fibrosis (FibroTest, HCV FibroSure) and necrosis (ActiTest) in patients with chronic hepatitis C. *Comparative hepatology* (2004). **3**(1) :8.
- [44] Ballestri, S., Lonardo, A., Romagnoli, D., Carulli, L., Losi, L., Day, C.P., and Loria, P. Ultrasonographic fatty liver indicator, a novel score which rules out NASH and is correlated with metabolic parameters in NAFLD. *Liver International* (2012). **32**(8) :1242–1252.
- [45] Hamaguchi, M., Kojima, T., Itoh, Y., Harano, Y., Fujii, K., Nakajima, T., Kato, T., Takeda, N., Okuda, J., Ida, K., et al. The severity of ultrasonographic findings in nonalcoholic fatty liver disease reflects the metabolic syndrome and visceral fat accumulation. *The American journal of gastroenterology* (2007). **102**(12) :2708–2715.
- [46] Festi, D., Schiumerini, R., Marasco, G., Scaioli, E., Pasqui, F., and Colecchia, A. Non-invasive diagnostic approach to non-alcoholic fatty liver disease : current evidence and future perspectives. *Expert review of gastroenterology & hepatology* (2015). (0) :1–15.
- [47] Strauss, S., Gavish, E., Gottlieb, P., and Katsnelson, L. Interobserver and intraobserver variability in the sonographic assessment of fatty liver. *American Journal of Roentgenology* (2007). **189**(6) :W320–W323.
- [48] Schwenzler, N.F., Springer, F., Schraml, C., Stefan, N., Machann, J., and Schick, F. Non-invasive assessment and quantification of liver steatosis by

- ultrasound, computed tomography and magnetic resonance. *Journal of hepatology* (2009). **51**(3) :433–445.
- [49] Lédighen, V., Vergniol, J., Foucher, J., Merrouche, W., and Bail, B. Non-invasive diagnosis of liver steatosis using controlled attenuation parameter (CAP) and transient elastography. *Liver International* (2012). **32**(6) :911–918.
- [50] Park, S.H., Kim, P.N., Kim, K.W., Lee, S.W., Yoon, S.E., Park, S.W., Ha, H.K., Lee, M.G., Hwang, S., Lee, S.G., et al. Macrovesicular Hepatic Steatosis in Living Liver Donors : Use of CT for Quantitative and Qualitative Assessment 1. *Radiology* (2006). **239**(1) :105–112.
- [51] Panicek, D.M., Giess, C.S., and Schwartz, L.H. Qualitative assessment of liver for fatty infiltration on contrast-enhanced CT : is muscle a better standard of reference than spleen? *Journal of computer assisted tomography* (1997). **21**(5) :699–705.
- [52] Dixon, W.T. Simple proton spectroscopic imaging. *Radiology* (1984). **153**(1) :189–194.
- [53] Glover, G. and Schneider, E. Three-point dixon technique for true water/fat decomposition with B0 inhomogeneity correction. *Magnetic resonance in medicine* (1991). **18**(2) :371–383.
- [54] Reeder, S.B., Wen, Z., Yu, H., Pineda, A.R., Gold, G.E., Markl, M., and Pelc, N.J. Multicoil Dixon chemical species separation with an iterative least-squares estimation method. *Magnetic Resonance in Medicine* (2004). **51**(1) :35–45.
- [55] Reeder, S.B., Pineda, A.R., Wen, Z., Shimakawa, A., Yu, H., Brittain, J.H., Gold, G.E., Beaulieu, C.H., and Pelc, N.J. Iterative decomposition of water and fat with echo asymmetry and least-squares estimation (IDEAL) : application with fast spin-echo imaging. *Magnetic resonance in medicine* (2005). **54**(3) :636–644.
- [56] Yu, H., McKenzie, C.A., Shimakawa, A., Vu, A.T., Brau, A., Beatty, P.J., Pineda, A.R., Brittain, J.H., and Reeder, S.B. Multiecho reconstruction for simultaneous water-fat decomposition and T2* estimation. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* (2007). **26**(4) :1153–1161.
- [57] van Werven, J.R., Marsman, H.A., Nederveen, A.J., Smits, N.J., ten Kate, F.J., van Gulik, T.M., and Stoker, J. Assessment of Hepatic Steatosis in Patients Undergoing Liver Resection : Comparison of US, CT, T1-weighted

- Dual-Echo MR Imaging, and Point-resolved ^1H MR Spectroscopy 1. *Radiology* (2010). **256**(1) :159–168.
- [58] Tang, A., Tan, J., Sun, M., Hamilton, G., Bydder, M., Wolfson, T., Gamst, A.C., Middleton, M., Brunt, E.M., Loomba, R., et al. Nonalcoholic fatty liver disease : MR imaging of liver proton density fat fraction to assess hepatic steatosis. *Radiology* (2013). **267**(2) :422–431.
- [59] Singer, P., Stolz, P., Gnauck, G., Schliack, V., Kettler, L.H., Honigmann, G., Thielke, H., and Buntrock, P. Fatty acid composition of liver triglycerides in various stages of fat deposition in the parenchyma. *Acta diabetologia latina* (1974). **11**(1) :32–42.
- [60] Araya, J., Rodrigo, R., Videla, L.A., Thielemann, L., Orellana, M., Pettinelli, P., and Poniachik, J. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical science* (2004). **106**(6) :635–643.
- [61] Sekiya, M., Yahagi, N., Matsuzaka, T., Najima, Y., Nakakuki, M., Nagai, R., Ishibashi, S., Osuga, J.i., Yamada, N., and Shimano, H. Polyunsaturated fatty acids ameliorate hepatic steatosis in obese mice by SREBP-1 suppression. *Hepatology* (2003). **38**(6) :1529–1539.
- [62] Kelley, D.S., Bartolini, G.L., Newman, J.W., Vemuri, M., and Mackey, B.E. Fatty acid composition of liver, adipose tissue, spleen, and heart of mice fed diets containing t10, c12-, and c9, t11-conjugated linoleic acid. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids* (2006). **74**(5) :331–338.
- [63] Ramamonjisoa, N., Ratiney, H., Mutel, E., Guillou, H., Mithieux, G., Pilleul, F., Rajas, F., Beuf, O., and Cavassila, S. In vivo hepatic lipid quantification using MRS at 7 Tesla in a mouse model of glycogen storage disease type 1a. *Journal of lipid research* (2013). **54**(7) :2010–2022.
- [64] Provencher, S.W. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magnetic Resonance in Medicine* (1993). **30**(6) :672–679.
- [65] Naressi, A., Couturier, C., Devos, J., Janssen, M., Mangeat, C., De Beer, R., and Graveron-Demilly, D. Java-based graphical user interface for the MRUI quantitation package. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine* (2001). **12**(2-3) :141–152.
- [66] Stefan, D., Di Cesare, F., Andrasescu, A., Popa, E., Lazariiev, A., Vescovo, E., Strbak, O., Williams, S., Starcuk, Z., Cabanas, M., et al. Quantitation

- of magnetic resonance spectroscopy signals : the jMRUI software package. *Measurement Science and Technology* (2009). **20**(10) :104035.
- [67] Marsman, H.A., van Werven, J.R., Nederveen, A.J., Ten Kate, F., Heger, M., Stoker, J., and van Gulik, T.M. Noninvasive quantification of hepatic steatosis in rats using 3.0 T ¹H-magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* (2010). **32**(1) :148–154.
- [68] Peng, X.G., Ju, S., Qin, Y., Fang, F., Cui, X., Liu, G., Ni, Y., and Teng, G.J. Quantification of liver fat in mice : comparing dual-echo Dixon imaging, chemical shift imaging, and ¹H-MR spectroscopy. *Journal of lipid research* (2011). **52**(10) :1847–1855.
- [69] Cheung, J.S., Fan, S.J., Gao, D.S., Chow, A.M., Yang, J., Man, K., and Wu, E.X. In vivo lipid profiling using proton magnetic resonance spectroscopy in an experimental liver fibrosis model. *Academic radiology* (2011). **18**(3) :377–383.
- [70] van Werven, J.R., Marsman, H.A., Nederveen, A.J., Fiebo, J., van Gulik, T.M., and Stoker, J. Hepatic lipid composition analysis using 3.0-T MR spectroscopy in a steatotic rat model. *Magnetic resonance imaging* (2012). **30**(1) :112–121.
- [71] Rijzewijk, L.J., van der Meer, R.W., Lubberink, M., Lamb, H.J., Romijn, J.A., de Roos, A., Twisk, J.W., Heine, R.J., Lammertsma, A.A., Smit, J.W., et al. Liver fat content in type 2 diabetes : relationship with hepatic perfusion and substrate metabolism. *Diabetes* (2010). **59**(11) :2747–2754.
- [72] Kim, H., Taksali, S.E., Dufour, S., Befroy, D., Goodman, T.R., Petersen, K.F., Shulman, G.I., Caprio, S., and Constable, R.T. Comparative MR study of hepatic fat quantification using single-voxel proton spectroscopy, two-point dixon and three-point IDEAL. *Magnetic Resonance in Medicine* (2008). **59**(3) :521–527.
- [73] Petersen, K.F., Dufour, S., Savage, D.B., Bilz, S., Solomon, G., Yonemitsu, S., Cline, G.W., Befroy, D., Zeman, L., Kahn, B.B., et al. The role of skeletal muscle insulin resistance in the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2007). **104**(31) :12587–12594.
- [74] Hennig, J., Nauerth, A., and Friedburg, H. RARE imaging : a fast imaging method for clinical MR. *Magnetic Resonance in Medicine* (1986). **3**(6) :823–833.

- [75] Kiefer, B., Grassner, J., and Hausman, R. Image acquisition in a second with half Fourier acquisition single-shot turbo spin-echo. *J Magn Reson Imaging* (1994). **4**(Suppl) :86–87.
- [76] Pansini, V.M., Monnet, A., Salleron, J., Penel, G., Migaud, H., and Cotten, A. Reproducibility of 1H MR spectroscopy of hip bone marrow at 3 tesla. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* (2012). **36**(6) :1445–1449.
- [77] Jiru, F., Skoch, A., Klose, U., Grodd, W., and Hajek, M. Error images for spectroscopic imaging by LCModel using Cramer–Rao bounds. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine* (2006). **19**(1) :1–14.
- [78] Gambarota, G., Xin, L., Perazzolo, C., Kohler, I., Mlynárik, V., and Gruetter, R. In vivo 1H NMR measurement of glycine in rat brain at 9.4 T at short echo time. *Magnetic Resonance in Medicine* (2008). **60**(3) :727–731.
- [79] Tkáč, I., Öz, G., Adriany, G., Uğurbil, K., and Gruetter, R. In vivo 1H NMR spectroscopy of the human brain at high magnetic fields : metabolite quantification at 4T vs. 7T. *Magnetic Resonance in Medicine* (2009). **62**(4) :868–879.
- [80] Krššák, M., Hofer, H., Wrba, F., Meyerspeer, M., Brehm, A., Lohninger, A., Steindl-Munda, P., Moser, E., Ferenci, P., and Roden, M. Non-invasive assessment of hepatic fat accumulation in chronic hepatitis C by 1 H magnetic resonance spectroscopy. *European journal of radiology* (2010). **74**(3) :e60–e66.
- [81] Hájek, M., Dezortová, M., Wagnerová, D., Škoch, A., Voska, L., Hejlová, I., and Trunečka, P. MR spectroscopy as a tool for in vivo determination of steatosis in liver transplant recipients. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine* (2011). **24**(5) :297–304.
- [82] Heger, M., Marsman, H.A., Bezemer, R., Cloos, M.A., van Golen, R.F., and van Gulik, T.M. Non-invasive quantification of triglyceride content in steatotic rat livers by 1 H-MRS : when water meets (too much) fat. *Academic radiology* (2011). **18**(12) :1582–1592.
- [83] Kreis, R. and Boesch, C. Bad spectra can be better than good spectra. In *ISMRM 11th scientific meeting, Toronto, Ontario, Canada* (2003) 264.
- [84] Kreis, R. Issues of spectral quality in clinical 1H-magnetic resonance spectroscopy and a gallery of artifacts. *NMR in Biomedicine* (2004). **17**(6) :361–381.
- [85] Pineda, N., Sharma, P., Xu, Q., Hu, X., Vos, M., and Martin, D.R. Measurement of Hepatic Lipid : High-Speed T2-Corrected Multiecho Acquisition

- at 1H MR Spectroscopy—A Rapid and Accurate Technique 1. *Radiology* (2009). **252**(2) :568–576.
- [86] Machann, J., Thamer, C., Schnoedt, B., Stefan, N., Haring, H.U., Claussen, C.D., Fritsche, A., and Schick, F. Hepatic lipid accumulation in healthy subjects : A comparative study using spectral fat-selective MRI and volume-localized 1H-MR spectroscopy. *Magnetic resonance in medicine* (2006). **55**(4) :913–917.
- [87] Reeder, S.B., Robson, P.M., Yu, H., Shimakawa, A., Hines, C.D., McKenzie, C.A., and Brittain, J.H. Quantification of hepatic steatosis with MRI : the effects of accurate fat spectral modeling. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* (2009). **29**(6) :1332–1339.
- [88] Raclot, T. and Groscolas, R. Selective mobilization of adipose tissue fatty acids during energy depletion in the rat. *Journal of lipid research* (1995). **36**(10) :2164–2173.
- [89] Lundbom, J., Hakkarainen, A., Fielding, B., Söderlund, S., Westerbacka, J., Taskinen, M.R., and Lundbom, N. Characterizing human adipose tissue lipids by long echo time 1H-MRS in vivo at 1.5 Tesla : validation by gas chromatography. *NMR in biomedicine* (2010). **23**(5) :466–472.
- [90] Field, C.J., Angel, A., and Clandinin, M.T. Relationship of diet to the fatty acid composition of human adipose tissue structural and stored lipids. *The American journal of clinical nutrition* (1985). **42**(6) :1206–1220.
- [91] Malcom, G.T., Bhattacharyya, A., Velez-Duran, M., Guzman, M., Oalmann, M., and Strong, J. Fatty acid composition of adipose tissue in humans : differences between subcutaneous sites. *The American journal of clinical nutrition* (1989). **50**(2) :288–291.
- [92] Li, X., Kuo, D., Schafer, A.L., Porzig, A., Link, T.M., Black, D., and Schwartz, A.V. Quantification of vertebral bone marrow fat content using 3 Tesla MR spectroscopy : reproducibility, vertebral variation, and applications in osteoporosis. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* (2011). **33**(4) :974–979.
- [93] Hamilton, G., Smith, D.L., Bydder, M., Nayak, K.S., and Hu, H.H. MR properties of brown and white adipose tissues. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* (2011). **34**(2) :468–473.
- [94] Dimitrov, I.E., Douglas, D., Ren, J., Smith, N.B., Webb, A.G., Sherry, A.D., and Malloy, C.R. In vivo determination of human breast fat composition

- by ^1H magnetic resonance spectroscopy at 7 T. *Magnetic Resonance in Medicine* (2012). **67**(1) :20–26.
- [95] Graaf, R.A., Klomp, D.W., Lijten, P.R., and Boer, V.O. Intramolecular zero-quantum-coherence 2D NMR spectroscopy of lipids in the human breast at 7 T. *Magnetic Resonance in Medicine* (2014). **71**(2) :451–457.
- [96] Soares, A.F., Lei, H., and Gruetter, R. Characterization of hepatic fatty acids in mice with reduced liver fat by ultra-short echo time ^1H -MRS at 14.1 T in vivo. *NMR in Biomedicine* (2015). **28**(8) :1009–1020.
- [97] Sharma, P., Martin, D.R., Pineda, N., Xu, Q., Vos, M., Anania, F., and Hu, X. Quantitative analysis of T2-correction in single-voxel magnetic resonance spectroscopy of hepatic lipid fraction. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* (2009). **29**(3) :629–635.
- [98] de Bazelaire, C.M., Duhamel, G.D., Rofsky, N.M., and Alsop, D.C. MR imaging relaxation times of abdominal and pelvic tissues measured in vivo at 3.0 T : preliminary results 1. *Radiology* (2004). **230**(3) :652–659.
- [99] Combe, N. and Rossignol-Castera, A. Huiles végétales et friture. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* (2010). **45**(6) :S44–S51.
- [100] Hamilton, G., Middleton, M.S., Hooker, J.C., Haufe, W.M., Forbang, N.I., Allison, M.A., Loomba, R., and Sirlin, C.B. In vivo breath-hold ^1H MRS simultaneous estimation of liver proton density fat fraction, and T1 and T2 of water and fat, with a multi-TR, multi-TE sequence. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* (2015).
- [101] Deslauriers, R., Somorjai, R.L., Geoffrion, Y., Kroft, T., Smith, I.C., and Saunders, J.K. ^1H and ^{13}C NMR studies of tissue from normal and diseased mice. Analysis of T1 and T2 relaxation profiles of triglycerides in liver. *NMR in Biomedicine* (1988). **1**(1) :32–43.
- [102] Ye, Q., Danzer, C.F., Fuchs, A., Wolfrum, C., and Rudin, M. Hepatic lipid composition differs between ob/ob and ob/+ control mice as determined by using in vivo localized proton magnetic resonance spectroscopy. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine* (2012). **25**(5) :381–389.
- [103] Nekolla, S., Gneiting, T., Syha, J., Deichmann, R., and Haase, A. T1 maps by K-space reduced snapshot-FLASH MRI. *Journal of computer assisted tomography* (1992). **16**(2) :327–332.

- [104] Bougnoux, P., Giraudeau, B., and Couet, C. Diet, cancer, and the lipidome. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* (2006). **15**(3) :416–421.
- [105] Yeung, D.K., Cheung, H.S., and Tse, G.M. Human Breast Lesions : Characterization with Contrast-enhanced in Vivo Proton MR Spectroscopy—Initial Results 1. *Radiology* (2001). **220**(1) :40–46.
- [106] Glade, M.J. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research Food, Nutrition, Physical Activity and the Prevention of Cancer : A Global Perspective 2007 American Institute for Cancer Research Washington, D. C ISBN : 978-0-9722522-2-5. *Nutrition* (2008). **24**(4) :393–398.
- [107] Thomas, M.A., Binesh, N., Yue, K., and DeBruhl, N. Volume-localized two-dimensional correlated magnetic resonance spectroscopy of human breast cancer. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* (2001). **14**(2) :181–186.
- [108] He, Q., Shkarin, P., Hooley, R.J., Lannin, D.R., Weinreb, J.C., and Bosuyt, V.I.J. In vivo MR spectroscopic imaging of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in healthy and cancerous breast tissues by selective multiple-quantum coherence transfer (Sel-MQC) : A preliminary study. *Magnetic Resonance in Medicine* (2007). **58**(6) :1079–1085.
- [109] Mine, Y. *Egg bioscience and biotechnology*. John Wiley & Sons (2008).
- [110] Sikorski, Z.Z. and Kolakowska, A. *Chemical and functional properties of food lipids*. CRC Press (2010).

Annexe A

Article publié dans le journal

*"Magnetic Resonance Materials in
Physics, Biology and Medecine"*

The effect of water suppression on the hepatic lipid quantification, as assessed by the LCModel, in a preclinical and clinical scenario

Amandine Coum^{1,2} · Fanny Noury^{1,2} · Elise Bannier³ · Karima Begriche⁴ · Bernard Fromenty⁴ · Yves Gandon³ · Hervé Saint-Jalmes^{1,2,5} · Giulio Gambarota^{1,2}

Received: 22 May 2015 / Revised: 3 November 2015 / Accepted: 4 November 2015
© ESMRMB 2015

Abstract

Objective To investigate the effect of water suppression on the hepatic lipid quantification, using the LCModel.

Materials and methods MR spectra with and without water suppression were acquired in the liver of mice at 4.7 T and patients at 3 T, and processed with the LCModel. The Cramér–Rao Lower Bound (CRLB) values of the seven lipid resonances were determined to assess the impact of water suppression on hepatic lipid quantification. A paired *t* test was used for comparison between the CRLBs obtained with and without water suppression.

Results For the preclinical data, in the high (low) fat fraction subset an overall impairment in hepatic lipid quantification, i.e. an increase of CRLBs (no significant change of CRLBs) was observed in spectra acquired with water suppression. For the clinical data, there were no substantial changes in the CRLB with water suppression. Because (1) the water suppression does not overall improve the quantification of the lipid resonances and (2) the MR spectrum without water suppression is always acquired for fat fraction calculation, the optimal data-acquisition strategy for

liver MRS is to acquire only the MR spectrum without water suppression.

Conclusion For quantification of hepatic lipid resonances, it is advantageous to perform MR spectroscopy without water suppression in a clinical and preclinical scenario (at moderate fields).

Keywords ¹H-MRS · Water suppression · Liver · Lipids · Quantification

Introduction

Obesity is rapidly becoming one of the major health concerns worldwide. An increasing morbidity and mortality connected with many obesity-related diseases, including type-2 diabetes, hypertension and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) have been observed in recent years [1]. Fuelled by this worldwide health problem, there has been a growing interest in lipid metabolism, both in the clinical and research settings, with particular focus on the quantification of lipids in liver [2–4].

For many years, biochemical and histochemical analyses of biopsies have been the gold standard for the lipid quantification. In the last decade, magnetic resonance imaging (MRI) and spectroscopy (MRS) have emerged as the methods of choice for assessment of lipid content [i.e. fat fraction (FF)] in liver [5–8]. The clear advantage of MR techniques over biopsies is that the MRI and MRS are non-invasive, thus can be performed repeatedly in longitudinal studies without risk of complications [9].

MRI and MRS provide complementary information regarding hepatic lipids. Using MRI, the FF can be determined over the whole liver volume, whereas with MRS the

✉ Amandine Coum
amandine.coum@gmail.com

¹ LTSI, Laboratoire du Traitement du Signal et de l'Image, Université de Rennes 1, 35043 Rennes Cedex, France

² INSERM, UMR 1099, Université de Rennes 1, 35000 Rennes, France

³ Département de Radiologie, CHU de Rennes, 35000 Rennes, France

⁴ INSERM, U991, Université de Rennes 1, 35000 Rennes, France

⁵ CRLCC, Centre Eugène Marquis, 35000 Rennes, France

FF as well as lipid composition can be measured [10]—only however over a limited volume with typical dimensions of $2 \times 2 \times 2 \text{ cm}^3$ in clinical studies. The assessment of lipid composition is achieved by measuring the resonance peaks of each lipid component, that is the methylene (CH_2)_n protons, the methyl (CH_3) protons, the olefinic protons, the α -methylene to carboxyl protons, the β -methylene to carboxyl protons, the α -olefinic protons and the diacyl protons [6].

The knowledge of lipid composition is essential for investigations of lipid metabolism and, in the last decade, MRS has been used to this purpose in many preclinical and clinical studies. From a data-acquisition point of view, two main approaches can be distinguished in MRS: one where, prior to excitation, water suppression pulses are used and the other where no water suppression is applied. To date, however, no study has systematically and quantitatively investigated the effect of water suppression on hepatic lipid quantification. For MR spectra, a means to determine the accuracy in the quantification of resonance peaks is provided by the Cramér–Rao Lower Bound (CRLB). Thus, the CRLB calculated for each lipid resonance can be used as a metric when comparing the different data-acquisition strategies.

Given the relevance of lipid composition in current research, it is of interest to determine the optimal data-acquisition strategy in order to improve the quantification of hepatic lipids, in both preclinical and clinical studies. The aim of this study was to investigate the effect of water suppression on the quantification of lipid resonances in liver, as assessed by the LCModel [11], in a pre-clinical and a clinical scenario. Data analysis was performed on MR spectra acquired in vivo at 4.7 T in mice and at 3 T in patients.

Materials and methods

Animals and patients

Fifteen c57BL/6Jrj female mice were used for the current study, including nine obese (ob/ob and db/db) mice (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France). The animals were 5 weeks old. For MR experiments, animals were anaesthetized by intra-peritoneal injection of ketamine (55 mg/kg) and xylazine (5.5 mg/kg). MR measurements on each mouse were performed at different time points (day 0, 14 and 28) in order to obtain spectra with different levels of hepatic fat overload, from small-moderate fatty infiltration to severe fatty infiltration.

Eleven patients (age = 49 ± 12 years) suspected of presenting hepatic fat overload were included in the

clinical study. All preclinical and clinical experiments were approved by the Animal Ethics Committee and Institutional Review Board, respectively.

In vivo ^1H MRS

MR experiments on mice were performed using a 4.7 T MR scanner (47/40 USR Bruker Biospec, Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen, Germany) with a BGA12 gradient system (maximum strength of 400 mT/m) and a birdcage coil (72 mm inner-diameter). During experiments, the mouse respiration rate was monitored using a fiber-optic pneumatic pillow (SA Instruments, Inc., Stony Brook, NY, USA) to synchronize the acquisition with the respiratory frequency. Multi-slice T_1 -weighted RARE images (RARE: Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement [12]) were acquired for anatomical localization, using the following parameters: TR = 900 ms, TE = 11.7 ms, 20 slices, a slice thickness of 1 mm, a field of view (FOV) of $5 \times 5 \text{ cm}^2$, a matrix of 192×192 and 3 signal averages. MRS was performed using the double spin-echo Point REsolved Spectroscopy (PRESS) sequence [13] in a voxel of interest (VOI) of $3 \times 3 \times 3 \text{ mm}^3$ positioned in the right lobe of the mouse liver. For each mouse, two MR spectra were acquired: (1) one spectrum without water suppression (TR = 4000 ms, TE = 11 ms, 64 signal averages) and (2) one spectrum with water suppression [TR = 2500 ms, TE = 11 ms, 64/256 signal averages (obese/control mice)]. The VAPOR water suppression module was used (VAPOR: Variable pulse Power and Optimized Relaxation delays [14]) with a spectral bandwidth of 150 Hz. Manual adjustment of the water suppression pulse gains was performed on each mouse to optimize the suppression of the water resonance.

MR experiments on patients were performed using a 3 T MR scanner (Verio, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany) with a 32-channel torso coil. Multi-slice T_2 -weighted HASTE images (HASTE: Half-Fourier Acquisition Single-shot Turbo Spin Echo [15]) were acquired for anatomical localization, using the following parameters: TR = 1000 ms, TE = 96 ms, 30 slices, a slice thickness of 5 mm, FOV of $38 \times 28 \text{ cm}^2$ and an in-plane resolution of $1.5 \times 1.2 \text{ mm}^2$. MRS was performed using the STimulated Echo Acquisition Mode (STEAM) sequence [16] in a VOI of $30 \times 30 \times 30 \text{ mm}^3$ placed in the right lobe of the liver avoiding large vessels. Similarly to the preclinical study, for each patient two MR spectra were acquired: (1) one spectrum without water suppression and (2) one spectrum with water suppression. The water suppression module was the WET water suppression (WET: Water suppression Enhanced through T_1 effect [17]) and all MRS acquisitions were performed under breath hold, with TR = 4000 ms, TE = 20 ms and 2 signal averages.

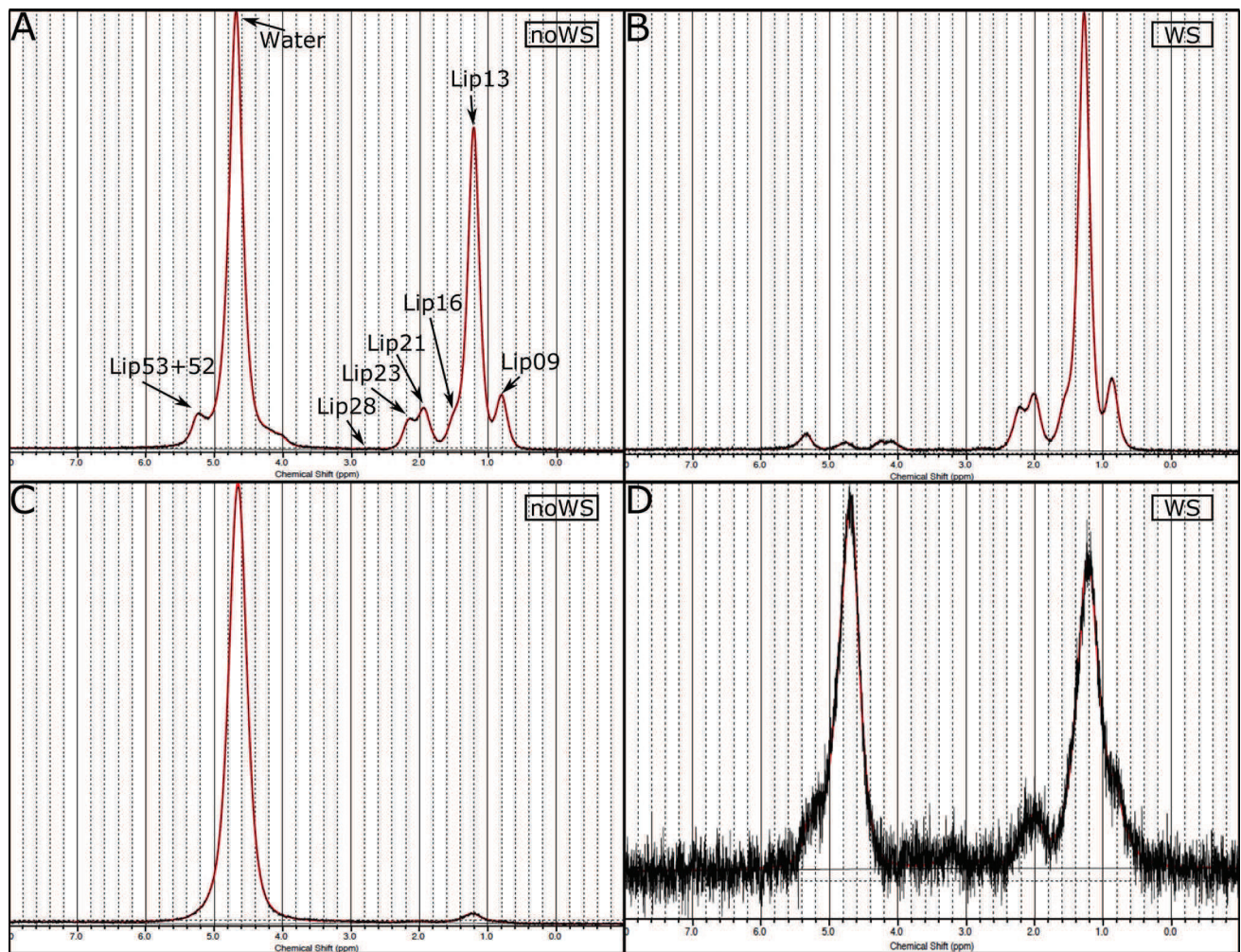


Fig. 1 ^1H MR spectra acquired on a mouse liver with a high fat fraction (FF = 36.5 %) without and with water suppression (**a**, **b** respectively), and on a mouse liver with a low fat fraction (FF = 2.0 %) without and with water suppression (**c**, **d** respectively). Each lipid

resonance is indicated by the arrows on the spectrum without water suppression (noWS) acquired on the mouse with high fat fraction. An efficient suppression of the water resonance (spectra WS) was achieved with the VAPOR method

Analysis of MRS data and statistical analysis

All MR spectra were processed with the LCModel (Version 6.3-0L, Stephen Provencher, Oakville, ON, Canada) without introduction of prior knowledge. Nine lipid resonances were identified, seven of those lipid resonances were used in the current study, as illustrated in Fig. 1. The Lip13 resonance area (originating from the $(\text{CH}_2)_n$ protons at 1.3 ppm) represents the major resonance and accounts for approximately 70 % of the total lipid signal. For this reason, it is often used to quantify the fat content. The other lipid resonances -with the exception of the Lip41 and Lip43 resonances (at 4.1 and 4.3 ppm, respectively) corresponding to the glycerol chain- provide information on the fat composition [18–20].

The LCModel employs a flexible combination of Gaussian and Lorentzian lineshapes to model the lipid

resonances. For each resonance, the LCModel provides (1) the ‘concentration’, measured as the resonance area (also commonly referred to as ‘peak area’ in the case of non-overlapping signals) and (2) the CRLB [21], which yields an estimate of measurement reliability. It should be noted that, when using the LCModel basis set for fat quantification, the user has no access to the individual curve fitting of each resonance. In all calculations, only the resonances displaying a CRLB < 10 % were considered.

The fat fraction (FF) was calculated from the MR spectra acquired without water suppression as the ratio of the Lip13 resonance area ([Lip13]) relative to the sum of the water and Lip13 resonances areas [4]. Preclinical and clinical spectra were each separated into two subsets considering an FF threshold of 15 %: the preclinical (clinical) subset with a high fat fraction (HFF) and the preclinical (clinical) subset with a low fat fraction (LFF).

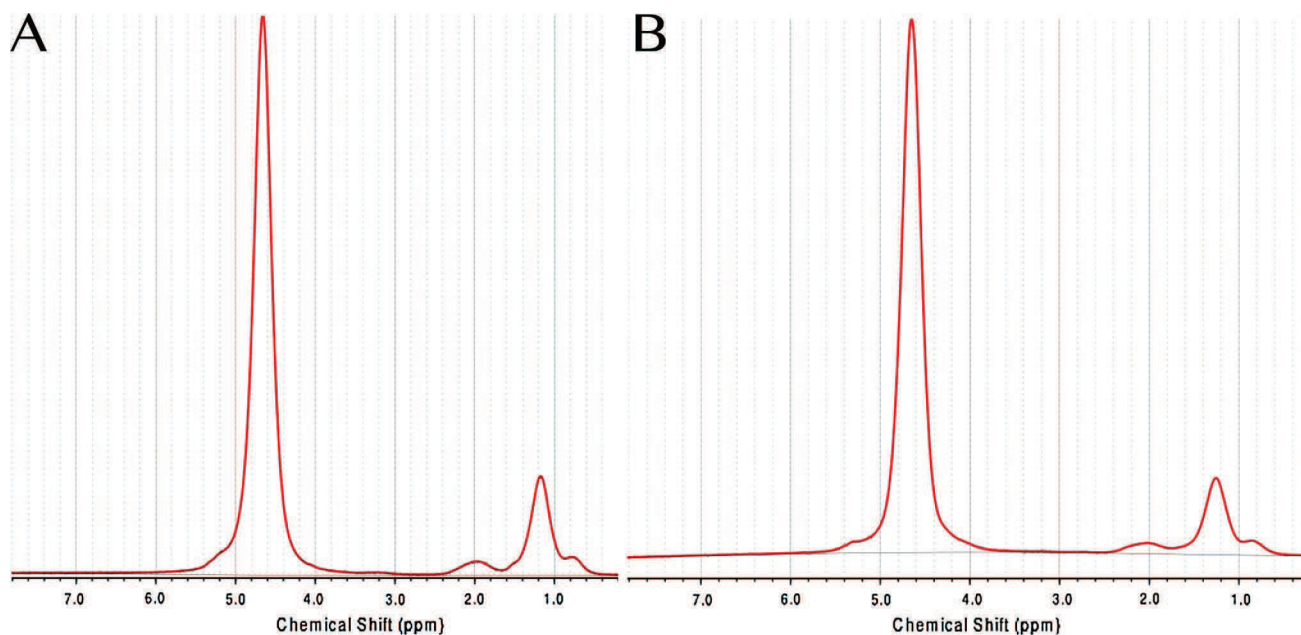


Fig. 2 ^1H MR spectra processed with the LCModel, acquired (a) at 4.7 T on a mouse liver with a fat fraction of 15.0 % and (b) at 3 T on a patient liver with a fat fraction of 13.0 %

A new parameter ‘ R ’ was introduced in order to assess the impact of the water suppression on the Lip53+52 resonance, which is very close to the water resonance. R was defined as the ratio of the resonance area of the Lip13 over the Lip53+52, that is, $R = [\text{Lip}_{13}]/[\text{Lip}_{53+52}]$. The parameter R was evaluated in spectra with and without water suppression. In the ideal case, the value of R would not change with the water suppression. An increase of R would indicate a reduction of the signal of the Lip53+52 due to the RF pulses of water suppression module. This parameter was calculated for preclinical and clinical data, only for spectra presenting a CRLB < 10 % for the Lip53+52 resonance.

In order to assess the effect of water suppression on the quantification of lipid resonances, a paired t test was used for comparison between the CRLBs of lipid resonances obtained with and without water suppression. The level of significance was set at 5 %.

Results

In vivo ^1H MRS

Figure 1 shows an example of a non-water-suppressed (noWS) and a water-suppressed (WS) spectrum acquired on a mouse liver with severe fatty infiltration (Fig. 1a, b respectively), and on a mouse liver with no fatty infiltration (Fig. 1c, d respectively). Each lipid resonance is indicated by the arrow on the non-water-suppressed spectrum on the mouse liver with severe fatty infiltration (Fig. 1a). In the

two spectra acquired on the mouse liver with severe fatty infiltration, a similar spectral quality of the lipid resonances can be observed (Fig. 1a, b). In the spectra acquired on the mouse liver without fatty infiltration (Fig. 1c, d), the only lipid resonance which is well above the noise level is the major lipid resonance (Lip13). An excellent water suppression was obtained with the VAPOR water suppression module in combination with the manual adjustment of the water suppression pulse gains (Fig. 1b, d).

Figure 2 shows a comparison of an MR spectrum acquired on a mouse liver at 4.7 T (Fig. 2a) and on a patient liver at 3 T (Fig. 2b) with moderate fatty infiltration. In these two spectra, the FF is comparable and approximately 15 %. The preclinical and clinical spectra display similar spectral features, validating the idea that similar acquisition strategies can be used for pre-clinical and clinical MRS acquisitions on liver at these field strengths.

Analysis of MRS data and statistical analysis

The preclinical and clinical datasets were each separated into two subsets: one subset with low fat fraction (LFF, FF < 15 %) and the other with high fat fraction (HFF, FF \geq 15 %). The preclinical (clinical) HFF subset included twenty-five (five) spectra, with a mean FF value of 26.9 ± 5.5 % (27.6 ± 7.8 %). The preclinical (clinical) LFF subset included thirteen (six) spectra, with a mean FF value of 1.6 ± 0.5 % (6.0 ± 3.5 %).

In the preclinical HFF subset ($n = 25$), an excellent quantification of the major lipid resonance (Lip13) was

Table 1 Cramér–Rao Lower Bound (CRLB) values of the Lip21 resonance (2.02 ppm)

	CRLB (%) noWS	CRLB (%) WS	Δ CRLB (%)	Fat fraction (%)
1	5	2	−150	19.9
2	6	4	−50	24.5
3	2	2	0	32.3
4	3	3	0	26.4
5	6	7	+14	17.6
6	3	4	+25	29.8
7	3	4	+25	19.7
8	3	4	+25	21.7
9	3	4	+25	25.5
10	2	3	+33	26.5
11	4	7	+43	26.4
12	3	6	+50	28.2
13	2	4	+50	30.3
14	2	4	+50	30.1
15	2	4	+50	30.9
16	7	16	+56	29.8
17	4	9	+56	30.3
18	2	5	+60	15.0
19	2	6	+67	34.8
20	1	3	+67	25.1
21	1	3	+67	36.5
22	2	9	+78	27.2
23	2	9	+78	36.1
24	1	5	+80	22.0
25	1	5	+80	25.5

MR spectra were acquired with (WS) and without (noWS) water suppression in mice ($n = 25$) with a hepatic fat fraction $\geq 15\%$. Overall, an increase of the CRLB values of the Lip21 resonance is observed in the spectra acquired with water suppression. The percentage difference between the CRLB with and without water suppression was calculated as $\Delta\text{CRLB} = 100 \cdot [\text{CRLB}_{\text{WS}} - \text{CRLB}_{\text{noWS}}] / \text{CRLB}_{\text{WS}}$. The last column shows the fat fraction calculated for each spectrum. The increase of CRLB values with water suppression indicates that the best acquisition strategy consists in acquiring MR spectra without water suppression

obtained in all cases with the CRLB values in the range of 1–2 %, because of the large fat fraction. The CRLB values of the Lip13 resonance were not improved (that is, the CRLB did not decrease) in spectra acquired with water suppression. With respect to the smaller lipids resonances (Lip21, etc.) a good quantification was also obtained because of the high fat content in the mice of this subset. For instance, the Lip21 resonance is important in lipids quantification to differentiate saturated and unsaturated fatty acids [18] (SFA and UFA, respectively). An example of the individual values of the CRLBs for the Lip21 resonance in each mouse is shown in Table 1. Here, an effect of the water suppression on the CRLB was observed, with an

overall increase of the CRLB in spectra acquired with water suppression (increase of 14–80 %, in 20 out of 25 mice). In the remaining cases, a small decrease, or no change, in the CRLB values was observed in spectra acquired with water suppression.

In the preclinical LFF subset ($n = 13$), the changes in the CRLB of the Lip13 resonance between spectra acquired with and without water suppression did not exhibit a clear pattern (Table 2). In 50 % of the cases, a degradation of the quantification (i.e. higher CRLBs) was observed in spectra acquired with water suppression. In the other 50 % of cases, the opposite was observed. The Lip21 resonance could not be reliably quantified ($\text{CRLB} > 10\%$) because of the low amount of fat. It should be noted that, in the preclinical LFF subset, the number of averages used for the acquisitions ($\text{NA} = 256$) with water suppression was higher than in the case of the acquisitions ($\text{NA} = 64$) without water suppression; this could explain the lack of differences observed in the CRLBs.

A similar analysis of the effect of water suppression on the lipid quantification was performed on the clinical dataset. For the clinical HFF subset ($n = 5$), an excellent quantification of the major lipid resonance (Lip13) was obtained in spectra acquired with and without water suppression, with the CRLB values in the range of 1–2 %—except for one case ($\text{CRLB} = 9\%$). In three cases, no changes were observed with water suppression. In two cases, the CRLB values were decreased with water suppression (from 2 to 1 %, and from 9 to 4 %). Concerning the lipid resonances other than the Lip13 resonance, it was possible to quantify reliably ($\text{CRLB} < 10\%$) the Lip21 resonance in both spectra acquired with and without water suppression in four out of five patients. The CRLB value range was 2–6 and 2–10 % in spectra acquired with and without water suppression, respectively.

In the clinical LFF subset ($n = 6$), the Lip13 was well quantified, in both spectra acquired with and without water suppression. The range of the CRLBs obtained with and without water suppression was 1–4 and 2–5 %, respectively. Overall, the water suppression had a negligible effect on the quantitation of the Lip13 resonance: a maximum of 2 % of absolute decrease was found in the CRLB with water suppression in only one case.

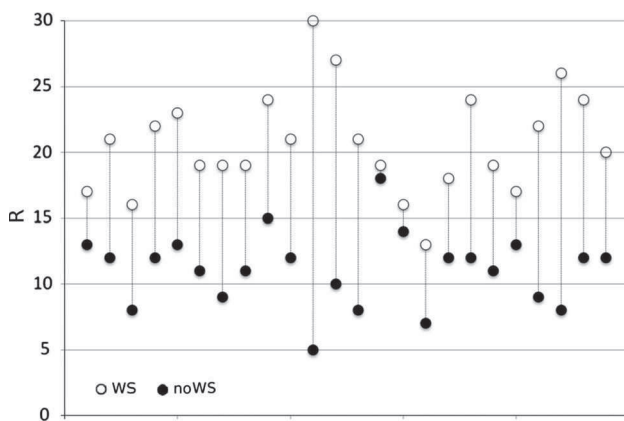
In summary, the analysis of CRLB values shows that the strategy of using water suppression for liver MR spectroscopy overall involves either no improvement, or a degradation of the spectral data.

The effect of the water suppression on the Lip53+52 resonance (at 5.3 ppm) is illustrated by the calculation of the parameter R , defined in the “Materials and methods” section. For preclinical data, the parameter R was evaluated for the spectrum with and without water suppression. In all cases, the R value was higher for the spectrum

Table 2 Cramér–Rao Lower Bound (CRLB) values of the Lip13 resonance (1.3 ppm)

	CRLB (%) noWS	CRLB (%) WS	Δ CRLB (%)	Fat fraction (%)
1	20	5	−300	0.5
2	7	3	−133	2.0
3	4	3	−33	1.7
4	5	4	−25	1.4
5	4	4	0	1.9
6	5	5	0	0.8
7	3	3	0	1.5
8	2	3	+33	2.2
9	6	9	+33	1.4
10	3	6	+50	1.6
11	2	4	+50	1.9
12	3	10	+70	1.5
13	4	13	+70	2.0

MR spectra were acquired with (WS) and without (noWS) water suppression in mice ($n = 13$) with a small hepatic fat fraction. The percentage difference between the CRLB with and without water suppression was calculated as $\Delta\text{CRLB} = 100 * [\text{CRLB}_{\text{WS}} - \text{CRLB}_{\text{noWS}}] / \text{CRLB}_{\text{WS}}$. The last column shows the fat fraction calculated for each spectrum

**Fig. 3** Graphical representation of the ratio R ($R = [\text{Lip}_{13}] / [\text{Lip}_{53+52}]$) calculated from spectra acquired on mice presenting a high hepatic fat fraction ($\geq 15\%$) with (WS) or without (noWS) water suppression. This parameter was calculated only for spectra presenting a CRLB $< 10\%$ for the Lip53+52 (5.3 ppm) resonance ($n = 24$). The connecting lines have been drawn to aid visual comparison

acquired with water suppression (Fig. 3). Similar results were obtained for the clinical data.

For preclinical data (Table 3), in the HFF subset the paired t test highlighted a strong correlation between the strategy to acquire MR spectra with water suppression and a degradation of the quantification of the lipid resonances (p value range: 0.0002–0.0392), with the only exception of

Table 3 p values of paired t test between the CRLB of each lipid resonance calculated from spectra acquired with (WS) or without (noWS) water suppression

	High fat fraction ($N = 25$)		Low fat fraction ($N = 13$)	
	WS	NoWS	WS	NoWS
Lip09		0.0022**		0.3094
Lip13		0.0042**		0.8499
Lip16		0.0392*		
Lip21		0.0002**		
Lip23		0.0116*		
Lip53+52	0.0026**			

MR spectra were acquired in mice with a high fat fraction ($\geq 5\%$) and in mice a low fat fraction ($< 15\%$). The CRLB of lipid resonances are always lower without water suppression, except for the Lip53+52 resonance

** p value < 0.01 ; * p value < 0.05

the Lip53+52 resonance (p value = 0.0026). In the case of the LFF subset, no statistically significant difference was found between the lipid resonances quantification obtained from spectra acquired with or without water suppression (p values of 0.30 and 0.85 for Lip09 and Lip13 resonances, respectively).

For clinical data, in the HFF subset there was no statistically significant difference between the Lip13 resonance quantification obtained from spectra acquired with or without water suppression (p values of 0.14). The same result applied to the quantification of the Lip21 resonance (p value of 0.27). In the LFF subset, for the Lip13 (the only lipid resonance that could be reliably quantified) the paired t test showed a correlation between the strategy to acquire MR spectra with water suppression and an improvement in the quantification of the lipid resonances (p value = 0.006). However, since the CRLB values are similar in both strategies, we can consider that this improvement is negligible. In summary, the statistical analysis of our results shows that the strategy of using water suppression for liver MR spectroscopy involves either a deterioration of spectral data or, in best case scenario, no improvement.

Discussion

In the current study, a quantitative assessment of the impact of water suppression on the hepatic lipid quantification was performed. To date, in both preclinical and clinical studies there is no established approach with respect to the data acquisition of MR spectra in liver. In particular, to determine the fat percentage and composition, the experimental protocol includes in some cases two MR spectra (one

with and the other without water suppression) [3, 9, 14, 18, 20, 22–25] and in other cases only one MR spectrum (without water suppression) [2, 4, 6, 8, 19, 26–32]. In the current study, MR spectra with and without water suppression were acquired in patients, at 3 T, and in mice, at the moderate field of 4.7 T. The CRLB of each lipid resonance, evaluated by the LCModel, was used as a metric to determine the effect of water suppression on the hepatic lipid quantification. The CRLBs obtained from the analysis of spectra acquired with water suppression were compared to those obtained from spectra without water suppression. The analysis of CRLB of the lipid resonances showed that there is no benefit in acquiring the MR spectrum with water suppression since it does not improve the quantification of these resonances. In addition, water suppression results in degradation of the lipid resonance nearby the water resonance. Thus, the results of the current study indicate that—for the experimental conditions of the current work—it is possible to shorten the experimental protocol without loss of information by not acquiring an additive MR spectrum with water suppression.

It should be noted that the experimental conditions of this study—in particular the magnetic field strength—are similar to those of previous studies performed in clinical settings, where the 3 T MRI systems are becoming increasingly common [6], and in preclinical models. Interestingly, many preclinical works in mouse and rat liver have been performed at moderate magnetic field strengths [18, 22, 26, 30]. This is in stark contrast to MR spectroscopy of brain where the majority of the preclinical studies is performed at magnetic field strength ≥ 7 T [14]. Thus, the results of the current study are relevant and of interest to the MR scientists working on liver spectroscopy both in clinical and preclinical models.

With respect to the data analysis of *in vivo* MR spectra of hepatic lipids, different dedicated software and models are currently used, without a well-established method. This is due to the fact that the precise line shape of the lipid resonances is not known *a priori*. As a matter of fact, given the complex structure of the triglyceride molecule, quantum mechanics simulations based on the density matrix formalism can model the spectral shape of lipid resonances only to a certain extent. As a consequence, current fitting methods employ empirical approaches. In particular, the software used in the current study (LCModel) employs a combination of Gaussians and Lorentzians for each lipid resonance to determine the area under the resonance peak. It should be noted here that a different scenario characterizes the data analysis of MR spectra acquired in organs other than liver. In MRS of brain and prostate, for instance, it is possible to model the line shapes corresponding to each metabolite (glutamate, myoinositol citrate, etc.) with a high level of precision using quantum mechanics simulations;

as a result, it is possible to use this information as *a priori* knowledge in data fitting.

The water suppression module that is typically used on clinical scanners consists of 2–4 CHESS (CHemical Shift-Selective) pulses, whereas more sophisticated approaches are available on preclinical scanners. The water suppression module employed in the current study on the clinical scanner was WET with 3 CHESS pulses, and on the preclinical scanner was VAPOR with 7 CHESS pulses. For the MR data acquisition performed on the clinical scanner, no manual adjustment of the water suppression was done. As a result, incomplete water suppression was observed in some spectra. On the contrary, in the preclinical experiment the use of VAPOR—in addition to the manual adjustment of the water suppression pulse gains—resulted in excellent water suppression. It should be noted that in most clinical studies, due to time constraints, manual adjustments—if available—are rarely performed.

In the current study, a systematic effect was observed on the quantification of the Lip53+52 resonance in the MR spectra acquired with and without water suppression, on mice. The parameter *R*, defined in the “[Materials and methods](#)” section, was used to quantify this effect. The value of *R* with water suppression was lower than the value of *R* without water suppression. Since there is no ground truth for the value of the Lip53+52 resonance in our experimental conditions, from the current data it is not possible to determine which is the best approach to quantify this resonance. As mentioned previously, when considering the literature regarding preclinical studies performed at similar field strength (3 T–4.7 T), there is no established method of data acquisition (with or without water suppression) for the lipid quantification. In some preclinical studies, MR spectra were acquired with water suppression, however the Lip53+52 resonance was not used in the quantification, since it could have been damaged by the water suppression [22]; in other studies, on the other hand, no water suppression was used [23–27]. Based on the results of the current study, it is not clear which is the most beneficial approach for the quantification of the Lip53+52, at the moderate field of 4.7 T.

In clinical studies of liver pathologies the biomarker of interest is the fat content, which can be determined using the major lipid resonance at 1.3 ppm. For instance, a biomarker for the diagnosis of steatosis is based on a 5 % fat content threshold. The hepatic lipid composition is rarely assessed; however, the quantification of hepatic lipid composition could be of great interest to gain insight into the lipid metabolism in liver. Intuitively, it might seem natural to acquire MR spectra in liver with the water suppression, as it is done in MRS of brain, to improve the detection of the smaller lipid resonances. The results of the current study show that there is no improvement in the

quantification of lipid resonances by employing the water suppression; this applies to the quantification of both fat content as well as fat composition. As a consequence, the clinical protocol can be shortened by acquiring only the non-water-suppressed MR spectrum.

Conclusion

The results of the current study indicate that, for quantification of lipid resonances in liver, it is advantageous to perform MR spectroscopy without water suppression. This applies to the quantification of fat fraction as well as fat composition, both in preclinical and clinical scenario (at moderate fields). As a consequence, the preclinical and clinical protocols can be shortened by only acquiring an MR spectrum without water suppression.

Acknowledgments We are most grateful to the PRISM core facility (Biogenouest®, UMS Biosit, Université de Rennes 1—Campus de Villejean, 35043 Rennes Cedex, France) for its technical support.

Author's contribution Coum A.: Protocol/project development, data collection and management, data analysis, Noury F.: Protocol/project development, data collection and management, data analysis, Bannier E.: Protocol/project development, data collection and management, Begriche K.: Protocol/project development, Fromenty B.: Protocol/project development, Gandon Y.: Protocol/project development, Saint-Jalmes H.: Protocol/project development, Gambarota G.: Protocol/project development.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Research involving human participants and animals All applicable national guidelines for the care and use of animals were followed.

Informed consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Appendix

In this appendix, an additional analysis of the MR data is given in order to provide further insight into the current study. In the preclinical (clinical) HFF subset, the mean value of the full width at half maximum (FWHM) of the water resonance was 53 ± 7 Hz (46 ± 18 Hz). The preclinical (clinical) LFF subset presented a mean value of

FWHM of the water resonance of 59 ± 13 Hz (32 ± 9 Hz). The linewidth observed on the preclinical data is in agreement with a previous study performed at 4.7 T on mouse liver [18].

The noise level without water suppression was 163 ± 31 (a.u.) and with water suppression was 179 ± 44 (a.u.) on the preclinical HFF subset. Thus, it appears that the VAPOR water suppression did not affect the noise level.

The quantification of the lipid composition was calculated using the Corbin et al. algorithm [18] on the HFF groups (preclinical and clinical) with and without water suppression. It should be pointed out that in the Corbin method, the UFA fraction is calculated as: $100 * \frac{3}{4} * \frac{[Lip21]}{[Lip09]}$; and the SFA fraction is calculated as: $100 - UFA$. On the preclinical HFF subset, the results were of $SFA = 29.23\%$ and $UFA = 70.77\%$ (in both cases the standard deviation was of 4.6 %) without water suppression. With water suppression the results were $SFA = 30.88\%$ and $UFA = 69.12\%$ (in both cases the standard deviation was of 5.29 %). On the clinical HFF subset, the quantification of the lipid composition yielded the results of $SFA = 43.25\%$ and $UFA = 56.75\%$ (standard deviation = 6.08 %) without water suppression and $SFA = 39.65\%$ and $UFA = 60.35\%$ (standard deviation = 5.60 %) with water suppression. The values of saturated and unsaturated fatty-acid fractions obtained from spectra with water suppression were comparable to those from spectra without water suppression, both for clinical and preclinical data.

References

1. Fabbrini E, Sullivan S, Klein S (2010) Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology* 51:679–689
2. Cowin GJ, Jonsson JR, Bauer JD, Ash S, Ali A, Osland EJ, Purdie DM, Clouston AD, Powell EE, Galloway GJ (2008) Magnetic resonance imaging and spectroscopy for monitoring liver steatosis. *J Magn Reson Imaging* 28:937–945
3. Johnson NA, Walton DW, Sachinwalla T, Thompson C, Smith K, Ruell PA, Stannard SR, George J (2008) Noninvasive assessment of hepatic lipid composition: advancing understanding and management of fatty liver disorders. *Hepatology* 47:1513–1523
4. Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, Browning JD, Reingold JS, Grundy S, Hobbs HH, Dobbins RL (2005) Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:E462–E468
5. Machann J, Stefan N, Schick F (2008) 1H MR spectroscopy of skeletal muscle, liver and bone marrow. *Eur J Radiol* 67:275–284
6. Hamilton G, Yokoo T, Bydder M, Cruite I, Schroeder ME, Sirlin CB, Middleton MS (2011) In vivo characterization of the liver fat 1H MR spectrum. *NMR Biomed* 24:784–790
7. Thomsen C, Becker U, Winkler K, Christoffersen P, Jensen M, Henriksen O (1994) Quantification of liver fat using magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Imaging* 12:487–495

8. Thomas EL, Hamilton G, Patel N, O'Dwyer R, Doré CJ, Goldin RD, Bell JD, Taylor-Robinson SD (2005) Hepatic triglyceride content and its relation to body adiposity: a magnetic resonance imaging and proton magnetic resonance spectroscopy study. *Gut* 54:122–127
9. Ye Q, Danzer CF, Fuchs A, Vats D, Wolfrum C, Rudin M (2013) Longitudinal evaluation of hepatic lipid deposition and composition in ob/ob and ob/+ control mice. *NMR Biomed* 26:1079–1088
10. Reeder SB, Cruite I, Hamilton G, Sirlin CB (2011) Quantitative assessment of liver fat with magnetic resonance imaging and spectroscopy. *J Magn Reson Imaging* 34:729–749
11. Provencher SW (1993) Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn Reson Med* 30:672–679
12. Hennig J, Nauerth A, Friedburg H (1986) RARE imaging: a fast imaging method for clinical MR. *Magn Reson Med* 3:823–833
13. Bottomley PA (1984) Selective volume method for performing localized NMR spectroscopy. US Patent 4, 480, 228
14. Tkac I, Starcuk Z, Choi IY, Gruetter R (1999) In vivo ^1H NMR spectroscopy of rat brain at 1 ms echo time. *Magn Reson Med* 41:649–656
15. Kiefer B, Grässner J, Hausmann R (1994) Image acquisition in a second with half-Fourier acquisition single shot turbo spin-echo. *J Magn Reson Imaging* 4:86–87
16. Frahm J, Merbolt KD, Hänicke W (1986) Localized proton spectroscopy using stimulated echoes. *J Magn Reson* 72:502–508
17. Ogg RJ, Kingsley PB, Taylor JS (1994) WET, a T_1 - and B_1 -insensitive water-suppression method for in vivo localized ^1H NMR spectroscopy. *J Magn Reson* 104:1–10
18. Corbin IR, Furth EE, Pickup S, Siegelman ES, Delikatny EJ (2009) In vivo assessment of hepatic triglycerides in murine non-alcoholic fatty liver disease using magnetic resonance spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Mol Cell Biol Lipid* 1791:757–763
19. Strobel K, van den Hoff J, Pietzsch J (2008) Localized proton magnetic resonance spectroscopy of lipids in adipose tissue at high spatial resolution in mice in vivo. *J Lipid Res* 49:473–480
20. Cheung JS, Fan SJ, Gao DS, Chow AM, Yang J, Man K, Wu EX (2011) In vivo lipid profiling using proton magnetic resonance spectroscopy in an experimental liver fibrosis model. *Acad Radiol* 18:377–383
21. Cavassila S, Deval S, Huegen C, van Ormondt D, Graveron-Demilly D (2001) Cramér-Rao bounds: an evaluation tool for quantification. *NMR Biomed* 14:278–283
22. van Werven JR, Marsman HA, Nederveen AJ, ten Kate FJ, van Gulik TM, Stoker J (2012) Hepatic lipid composition analysis using 3.0-T MR spectroscopy in a steatotic rat model. *Magn Reson Imaging* 30:112–121
23. Rijzewijk LJ, van der Meer RW, Lubberink M, Lamb HJ, Romijn JA, de Roos A, Twisk JW, Heine RJ, Lammertsma AA, Smit JWA, Diamant M (2010) Liver fat content in type 2 diabetes: relationship with hepatic perfusion and substrate metabolism. *Diabetes* 59:2747–2754
24. Kim H, Taksali SE, Dufour S, Befroy D, Goodman TR, Petersen KF, Shulman GI, Caprio S, Constable RT (2008) Comparative MR study of hepatic fat quantification using single-voxel proton spectroscopy, two-point dixon and three-point IDEAL. *Magn Reson Med* 59:521–527
25. Petersen KF, Dufour S, Savage DB, Bilz S, Solomon G, Yonemitsu S, Cline GW, Befroy D, Zemany L, Kahn BB, Papademetris X, Rothman DL, Shulman GI (2007) The role of skeletal muscle insulin resistance in the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:12587–12594
26. Marsman HA, van Werven JR, Nederveen AJ, Ten Kate FJ, Heger M, Stoker J, van Gulik TM (2010) Noninvasive quantification of hepatic steatosis in rats using 3.0 T ^1H -magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Imaging* 32:148–154
27. Peng XG, Ju S, Qin Y, Fang F, Cui X, Liu G, Ni Y, Teng GJ (2011) Quantification of liver fat in mice: comparing dual-echo Dixon imaging, chemical shift imaging, and ^1H -MR spectroscopy. *J Lipid Res* 52:1847–1855
28. Krššák M, Hofer H, Wrba F, Meyerspeer M, Brehm A, Lohninger A, Steindl-Munda P, Moser E, Ferenci P, Roden M (2010) Non-invasive assessment of hepatic fat accumulation in chronic hepatitis C by ^1H magnetic resonance spectroscopy. *Eur J Radiol* 74:e60–e66
29. Hájek M, Dezortová M, Wagnerová D, Škoch A, Voska L, Hejlová I, Trunečka P (2011) MR spectroscopy as a tool for in vivo determination of steatosis in liver transplant recipients. *Magn Reson Mater Phy Biol Med* 24:297–304
30. Heger M, Marsman HA, Bezemer R, Cloos MA, van Golen RF, van Gulik TM (2011) Non-invasive quantification of triglyceride content in steatotic rat livers by ^1H -MRS: when water meets (too much) fat. *Acad Radiol* 18:1582–1592
31. Pineda N, Sharma P, Xu Q, Hu X, Vos M, Martin DR (2009) Measurement of hepatic lipid: high-speed T2-corrected multi-echo acquisition at ^1H MR spectroscopy-A rapid and accurate technique. *Radiology* 252:568–576
32. Gambarota G, Tanner M, van der Graaf M, Mulkern RV, Newbould RD (2011) ^1H -MRS of hepatic fat using short TR at 3 T: SNR optimization and fast T2 relaxometry. *Magn Reson Mater Phy Biol Med* 24:339–345

Annexe B

Short communication publiée dans
le journal "*Magnetic Resonance
Materials in Physics, Biology and
Medecine*"

In vivo MR spectroscopy of human breast tissue: quantification of fatty acid composition at a clinical field strength (3 T)

Amandine Coum^{1,2} · Lobna Ouldamer^{3,4,5} · Fanny Noury^{1,2} · Laurent Barantin^{5,6} · Aymeric Saint-Hilaire⁷ · Anne Vilde⁷ · Philippe Bougnoux^{4,5,8} · Giulio Gambarota^{1,2}

Received: 24 July 2015 / Revised: 23 October 2015 / Accepted: 28 October 2015
© ESMRMB 2015

Abstract

Objective To evaluate the feasibility of in vivo measurement of the fatty acid (FA) composition of breast adipose tissue by MRS on a clinical platform.

Material and methods MRS experiments were performed at 3 T, using a STEAM sequence, on 25 patients diagnosed with breast cancer. MR spectra, acquired on healthy breast tissue, were analysed with the LCModel.

Results The measured values of the saturated fatty acid (SFA), mono-unsaturated fatty acid (MUFA) and poly-unsaturated fatty acid (PUFA) fractions were 23.8 ± 7.1 %, 55.4 ± 6.8 % and 20.8 ± 4.4 %, respectively. The values of SFA, MUFA and PUFA observed in the current study are in the same range as those found in two previous studies performed at 7 T.

Conclusion The results of the current study show that it is possible to quantify the fatty acid composition of breast tissue in vivo in a clinical setting (3 T).

Keywords MRS · Breast cancer · Fatty acid · Quantification

Introduction

Breast cancer is the most common cancer in women, representing approximately 25 % of cancer cases worldwide. Recent research efforts have focussed on the investigation of new biomarkers for cancer prevention, diagnosis or treatment. With respect to the diagnosis and treatment of breast cancer, the choline compound has been shown to be a biomarker of tumor malignancy, and many studies have been dedicated to the detection of this metabolite in vivo using magnetic resonance spectroscopy (MRS) [1–5]. In the field of cancer prevention, there has been a growing interest in the link between breast cancer and nutrition, with particular attention to past dietary intake. A number of studies have indicated that the adipose tissue fatty acid (FA) profile as assessed on biopsy could be a useful biomarker of dietary habits [6]. Thus the development of non-invasive methods for assessing lipid composition is of interest as a means of identifying populations at elevated risk of breast cancer.

Recent studies have investigated the feasibility of in vivo quantification of FA composition in breast tissue [7, 8] using high-field (7 T) MR scanners, which are not available in the majority of clinical settings. Therefore, in order to facilitate the collection of a large number of data, it is imperative that a method is developed for measuring FA composition within a clinical framework. Studies can then determine whether breast adipose tissue FA composition as assessed by in vivo MRS could be a useful biomarker of dietary habits. Indeed, within the context of breast cancer prevention, the nutritional aspect must be taken into account to ensure screening of populations at elevated risk.

The aim of the current study was to evaluate the feasibility of in vivo measurement of the FA composition of breast adipose tissue on a clinical platform. MRS experiments were performed at 3T, using a vendor-supplied pulse

✉ Amandine Coum
amandine.coum@gmail.com

¹ Université de Rennes 1, 35000 Rennes, France

² LTSI, INSERM, UMR 1099, 35000 Rennes, France

³ Département de Gynécologie, CHRU de Tours, 37044 Tours, France

⁴ INSERM U1069, 37044 Tours, France

⁵ Université François-Rabelais, 37044 Tours, France

⁶ INSERM U930, 37044 Tours, France

⁷ Département de Radiologie, CHRU de Tours, 37044 Tours, France

⁸ Département d'Oncologie, CHRU de Tours, 37044 Tours, France

sequence, on 25 patients diagnosed with breast cancer. Data were analysed using commercially available software.

Materials and methods

Twenty-five patients (age = 58.8 ± 12.7 years, BMI = 27.4 ± 6.1 kg/m²) diagnosed with breast cancer and referred to the hospital for an MRI exam were included in this study.

All experiments were approved by the institutional review board. MR experiments were performed on a 3T MR scanner (Verio; Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany) with a dedicated 16-channel advanced imaging (AI) breast coil. MRS was performed using the vendor-supplied STEAM (stimulated echo acquisition mode) sequence in a voxel of interest (VOI) of $15 \times 15 \times 15$ mm³ positioned in healthy breast tissue contralateral to the tumorous tissue. The choice of the contralateral side was made with the goal of collecting the FA composition profile of the breast tissue without contamination from the tumor. For each patient, an MR spectrum was acquired (without respiratory triggering) using the following parameters: TR = 2000 ms, TE = 20 ms, TM = 10 ms, 92 signal averages and 1024 data points. It is well known that the mechanical vibrations of the gradients can result in signal contamination, especially of the small lipid resonances, from modulation sidebands generated by the main Lip13 peak. In the current study, no precautions (such as the TE-averaging approach or the gradient polarity inversion method) were taken, because these options are not readily available on the vendor-supplied STEAM sequence.

MR spectra were analysed with the LCModel (Version 6.3-0L, Stephen Provencher, Oakville, ON, Canada) using

the standard basis set ‘breast-8’, which includes the lipids and choline resonances. For each spectrum, the baseline was automatically fitted by the LCModel. The LCModel requires as an input the MR spectrum with the center frequency set on the water resonance. In most cases, however, due to the low amount of water in the VOI, the automatic adjustment procedure of the MR scanner would set the carrier frequency to the value of the major lipid resonance [the (CH₂)_n protons, at 1.3 ppm]. For these spectra, pre-processing was performed using a custom-designed program developed in MATLAB (Version 8.1; MathWorks, Natick, MA, USA) in order to shift the spectrum center frequency to the water resonance. The lipid composition was calculated using the Lip21, Lip23 and Lip28 resonances (at 2.1, 2.3 and 2.8 ppm, respectively), as follows [9]:

$$\text{SFA} = 1 - (\text{MUFA} + \text{PUFA})$$

$$\text{MUFA} = \frac{1}{2} \cdot \frac{[\text{Lip21}]}{[\text{Lip23}]} - \text{PUFA}$$

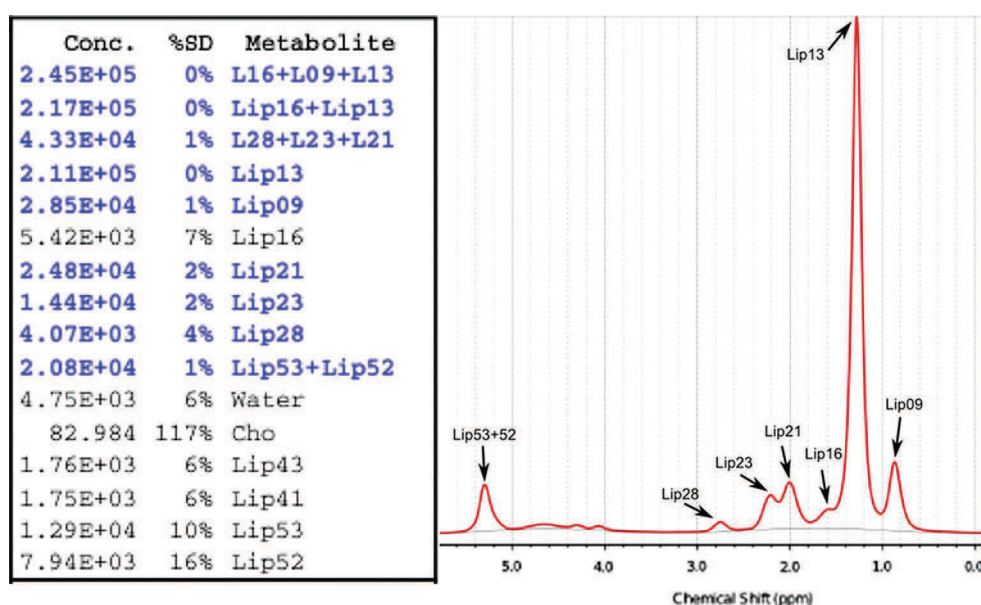
$$\text{PUFA} = \frac{[\text{Lip28}]}{[\text{Lip23}]}$$

where SFA, MUFA and PUFA are the saturated fatty acids, mono-unsaturated fatty acids and poly-unsaturated fatty acids, respectively.

Results

Figure 1 shows an example of an MR spectrum acquired on the breast tissue contralateral to the tumorous tissue. Each

Fig. 1 ¹H MR spectrum acquired at 3 T on breast tissue contralateral to the tumorous tissue. The arrows on the spectrum indicate each lipid resonance. The results of the LCModel show excellent quantification (CRLB < 5 %) of the lipid resonances used to calculate lipid composition (Lip21, Lip23 and Lip28)



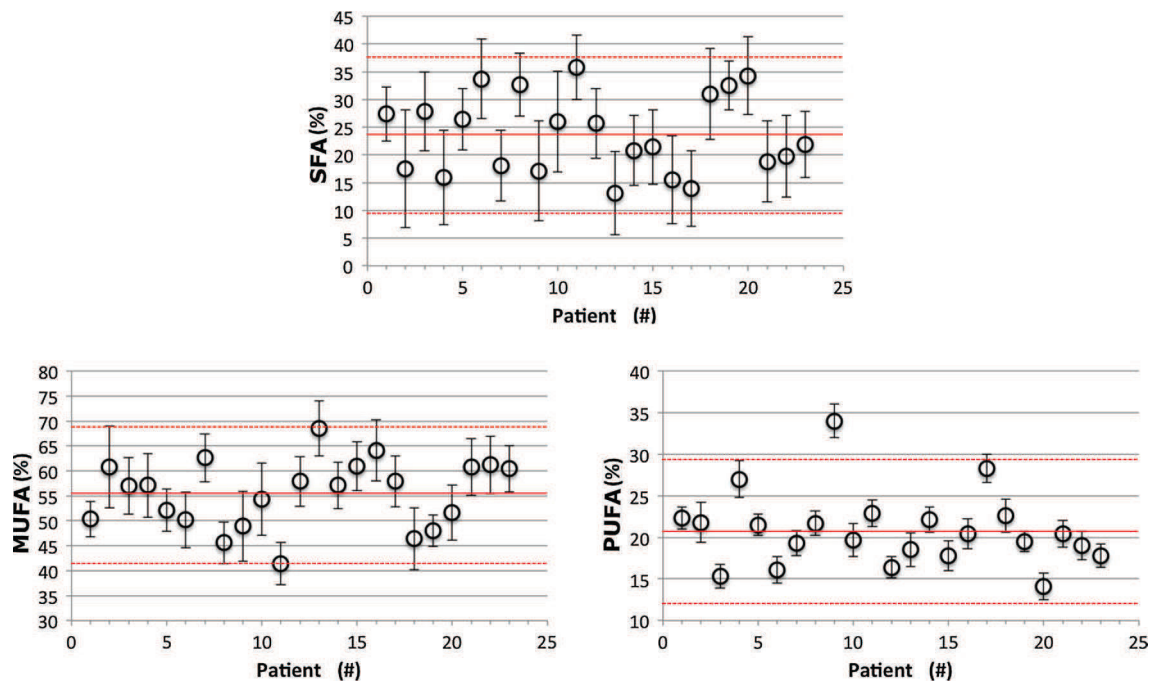


Fig. 2 Fractions of saturated (SFA), mono-unsaturated (MUFA) and poly-unsaturated (PUFA) fatty acids (in %) calculated for each patient ($n = 23$). On each graph, the *continuous horizontal line* represents the mean value among all patients, and the *dashed lines* indicate the 95 % CI

Table 1 Fatty acid fractions (mean \pm standard deviation) assessed on breast tissue in two previous studies performed at 7 T [7, 8] and in the current study at 3 T (SFA, MUFA and PUFA: saturated, mono-unsaturated and poly-unsaturated fatty acid, respectively)

	Dimitrov et al. [7]	Graaf et al. [8]	Current study
SFA (%)	28.7 \pm 8.4	27.0 \pm 8.7	23.8 \pm 7.0
MUFA (%)	48.5 \pm 7.9	51.2 \pm 8.4	55.4 \pm 5.4
PUFA (%)	22.7 \pm 3.1	21.8 \pm 9.8	20.8 \pm 1.7
Field strength	7 T	7 T	3 T

lipid resonance is indicated by an arrow. The adjacent table illustrates the results of the LCModel quantification. For each resonance, the resonance area (referred to as ‘Conc’ in the table) and the Cramér–Rao lower bound (CRLB, referred to as ‘SD’ in the table) of each lipid component are provided. Excellent quantification (CRLB < 5 %) of the three resonances (Lip21, Lip23 and Lip28) used for the calculation of FA composition was observed.

The FA composition was obtained in 23 of the 25 patients: in one patient, Lip28 quantification was not sufficiently precise (CRLB = 16 %), and in another patient the MR spectrum was not exploitable due to problems during data acquisition. The mean CRLB values of Lip21, Lip23 and Lip28 among all patients ($n = 23$) were 2.3, 2.5, 5.7 %, respectively.

Figure 2 shows the mean value of the SFA, MUFA and PUFA fractions calculated for each patient. The error

bars indicate standard deviations, which were obtained by applying the error propagation formula. The mean value of the SFA fraction was 23.8 ± 7.1 % with a 95 % confidence interval of [9.8; 37.8] (individual values falling into the range between 13 and 36 %). For the MUFA and PUFA, mean values were 55.4 ± 6.8 % (95 % CI [42.1; 68.8]; range 41–68 %) and 20.8 ± 4.4 % (95 % CI [12.1; 29.5]; range 14–28 %), respectively (Table 1).

Discussion

The identification of biomarkers in cancer pathologies is currently an area of great interest. The role of choline as a biomarker of tumor malignancy in breast cancer is well established [10]. Recent research efforts have been focussed on the effect of diet and nutrition on cancer prevention. Many studies have highlighted the importance of PUFA assessment for breast cancer prevention. For instance, researchers have suggested that the different types of PUFAs (ω_6 and ω_3) have different roles in breast cancer proliferation, namely, that the ω_3 play a preventive role by inhibiting proliferation of breast cancer cells, whereas the ω_6 act as promoters of this proliferation [11].

In the current study, we sought to determine whether it was possible to quantify breast adipose tissue FA composition, which could be a useful biomarker of past dietary intake. The results of the current work demonstrate the feasibility

of in vivo FA quantification of breast tissue in the clinical setting. This was accomplished using data acquisition and analysis methods readily available to the scientific community—the vendor-supplied STEAM sequence and LCModel analysis. As such, the results of the current study pave the way for exploring the role of FA composition in breast cancer.

Minor differences were observed between the values of SFA, MUFA and PUFA reported by Dimitrov et al. and Graaf et al. and those found in the current study (Table 1). Several possibilities may account for this difference. First, the dietary habits of the different cohorts are not known, and are likely to differ from those of French patients. Second, in the current study, no correction for possible differences in T_2 s of the Lip21, Lip23 and Lip28 resonances was applied in the quantification of fatty acid composition.

It should be noted that in most of the cases, pre-processing of the MRS data was necessary prior to the LCModel analysis. Alternatively, the carrier frequency can be set at the time of data acquisition during the adjustment procedure of the MR scanner; however, this is an operator-dependent maneuver, which may not be straightforward in the typical clinical setting.

In a previous study, the PUFA were detected, but not quantified, in breast cancer in vivo using a single-voxel 2D correlation spectroscopic sequence (L-COSY), which is not always available on clinical scanners [12]. In another study, the PUFA distribution in breast tissue (healthy or tumorous) was directly measured by MR spectroscopic imaging using a dedicated selective multiple-quantum coherence transfer (Sel-MQC) sequence [13]. Sel-MQC sequences are not available on clinical scanners, however, and do not allow for the complete quantification of FA composition. Similarly, it is important to note that the studies of Dimitrov et al. and Graaf et al. were performed on MRI scanners (operating at a field strength of 7 T), which are not typically available in hospital settings.

Conclusions

The results of the current study show that it is possible to quantify the fatty acid composition of breast tissue in vivo in a clinical setting (3 T).

Authors' contribution COUM A: Data analysis. OULDAMER L: Protocol/project development, data collection and management. NOURY F: Data analysis. BARANTIN L: Protocol/project development, data collection and management. SAINT-HILAIRE A: Protocol/project development. VILDE A: Protocol/project development. BOUGNOUX P: Protocol/project development. GAMBAROTA G: Protocol/project development.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional research committee and with the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

References

1. Glunde K, Artemov D, Penet MF, Jacobs MA, Bhujwalla ZM (2010) Magnetic resonance spectroscopy in metabolic and molecular imaging and diagnosis of cancer. *Chem Rev* 110:3043–3059
2. Kvistad KA, Bakken IJ, Gribbestad IS, Ehrnholm B, Lundgren S, Fjosne HE, Haraldseth O (1999) Characterization of neoplastic and normal human breast tissues with in vivo ^1H MR spectroscopy. *J Magn Reson Imaging* 10:159–164
3. Jagannathan NR, Kumar M, Seenu V, Coshic O, Dwivedi SN, Julka PK, Srivasta A, Rath GK (2001) Evaluation of total choline from in vivo volume localized proton MR spectroscopy and its response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Br J Cancer* 84:1016–1022
4. Yeung DK, Cheung HS, Tse GM (2001) Human breast lesions: characterization with contrast-enhanced in vivo proton MR spectroscopy—initial results. *Radiology* 220:40–46
5. Roebuck JR, Cecil KM, Schnall MD, Lenkinski RE (1998) Human breast lesions: characterization with proton MR spectroscopy. *Radiology* 209:269–275
6. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research (2007) Food, nutrition, physical activity and the prevention of cancer: a global perspective. AICR, Washington DC
7. Dimitrov IE, Douglas D, Ren J, Smith NB, Webb AG, Dean Sherry A, Malloy CR (2012) In vivo determination of human breast fat composition by ^1H magnetic resonance spectroscopy at 7T. *Magn Reson Med* 67:20–26
8. Graaf RA, Klomp DWJ, Luitjen PR, Boer VA (2014) Intramolecular zero-quantum-coherence 2D NMR spectroscopy of lipids in the human breast at 7T. *Magn Reson Med* 71:451–457
9. Ren J, Dimitrov I, Dean Sherry A, Malloy CR (2008) Composition of adipose tissue and marrow fat in humans by ^1H NMR at 7 Tesla. *J Lipid Res* 49:2055–2062
10. Baltzer PA, Dietzel M (2013) Breast lesions: diagnosis by using proton MR spectroscopy at 1.5 and 3.0 T—systematic review and meta-analysis. *Radiology* 267:735–746
11. Chénais B, Blanckaert V (2012) The janus face of lipids in human breast cancer: how polyunsaturated fatty acids affect tumor cell hallmarks. *Int J Breast Cancer*. doi:10.1155/2012/712536
12. Thomas MA, Binesh N, Yue K, DeBruhl N (2001) Volume-localized two-dimensional correlated magnetic resonance spectroscopy of human breast cancer. *J Magn Reson Imaging* 14:181–186
13. He Q, Shkarin P, Hooley RJ, Lannin DR, Weinreb JC, Bossuyt VI (2007) In vivo MR spectroscopic imaging of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in healthy and cancerous breast tissues by selective multiple-quantum coherence transfer (Sel-MQC): a preliminary study. *Magn Reson Med* 58:1079–1085

Résumé

Motivées par l'observation mondiale de l'augmentation de la morbidité et de la mortalité associées à des pathologies liées à l'obésité, dont la stéatose, les études pré-cliniques et cliniques s'intéressent à la recherche de nouveaux biomarqueurs pour le diagnostic de la stéatose. Actuellement, la stéatose est diagnostiquée et gradée par des analyses histologiques à partir d'une biopsie du foie. Dans l'intérêt du patient, et afin de permettre un suivi de la stéatose lors d'un régime ou d'un traitement, il est apparu important de se tourner vers des modalités de diagnostic moins invasives. Dans ce cadre, la spectroscopie par résonance magnétique (SRM), non-invasive et non-ionisante, est une méthode de choix pour le diagnostic de la stéatose par la mesure de la fraction lipidique hépatique. De plus, à partir des informations observables sur un spectre de SRM acquis au niveau hépatique, il est possible d'envisager une quantification de la composition en acides gras (AG) des lipides hépatiques, potentiel biomarqueur pour le suivi d'une stéatose.

Les travaux de cette thèse ont été réalisés à partir d'objets-tests, et dans le cadre d'études pré-cliniques (4,7 T) et cliniques (3,0 T). Une étude du protocole d'acquisition de spectres de SRM pour la quantification de la composition en AG des lipides a été réalisée, avec notamment un questionnement quant à la nécessité de l'utilisation d'un module de suppression du signal de l'eau. Un état de l'art des algorithmes de quantification de la composition en AG des lipides a été effectué, et des tests de validations de ces algorithmes ont été réalisés afin de déterminer le plus approprié à la problématique hépatique, dans nos conditions expérimentales. Enfin, toujours dans l'objectif de déterminer des nouveaux biomarqueurs de la stéatose, une méthode de mesure par SRM *in vivo* du T_1 de l'eau et de la résonance majeure des lipides hépatiques (LOREEDE pour *LOngitudinal RElaxation time Evaluation from Dynamic Equilibrium*) a été développée, et validée au cours d'une étude préliminaire sur des objets-tests et *in vivo* sur modèle murin.

Abstract

In recent years, there has been an unprecedented increase in the morbidity and mortality associated with diseases such as the steatosis, linked to obesity. In this context, pre-clinical and clinical studies are of interest in the search for new biomarkers allowing the diagnosis of steatosis. Currently, steatosis is diagnosed and graded by histological analyzes from a liver biopsy. On the other hand, it is advantageous to use non-invasive diagnostic modalities, especially in longitudinal studies. In this context, magnetic resonance spectroscopy (MRS), as a non-invasive and non-ionizing approach, is an attractive alternative method for the diagnosis of steatosis by measuring the hepatic fat fraction. Moreover, from the MRS spectrum acquired in the liver, it is possible to quantify the fatty acids (FA) composition of the hepatic lipids, which could be a potential biomarker for the follow-up of steatosis.

The work of this thesis has been performed *in vitro* and *in vivo*, in the context of pre-clinical (4.7 T) and clinical (3.0 T) studies. An investigation of the optimal MRS acquisition protocol for the quantification of FA was carried out, with particular attention to the role of the water signal suppression module. Different quantification algorithms of the lipid composition were studied and validation of these algorithms was carried out *in vitro* and *in vivo*. Finally, still with the objective of determining new biomarkers of steatosis, a method (LOREEDE : *LOngitudinal RElaxation time Evaluation from Dynamic Equilibrium*) for the measurement *in vivo* of the T_1 of the water resonance and the major lipid resonance, by MRS, was developed and validated in a preliminary study.

